



Sveučilište u Zagrebu

FIZIČKI ODSJEK

PRIRODOSLOVNO MATEMATIČKOG FAKULTETA

Hrvoje Brkić

**PROUČAVANJE DIOKSIGENAZA  
OVISNIH O ŽELJEZU RAČUNALNIM  
METODAMA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2014.







University of Zagreb

PHYSICS DEPARTMENT

FACULTY OF SCIENCE

Hrvoje Brkić

**COMPUTATIONAL STUDIES OF IRON  
DEPENDENT DIOXYGENASES**

DOCTORAL THESIS

ZAGREB, 2014.





Sveučilište u Zagrebu

FIZIČKI ODSJEK

PRIRODOSLOVNO MATEMATIČKOG FAKULTETA

Hrvoje Brkić

**PROUČAVANJE DIOKSIGENAZA  
OVISNIH O ŽELJEZU RAČUNALNIM  
METODAMA**

DOKTORSKI RAD

Mentor:

Prof. dr. sc. Sanja Tomić

ZAGREB, 2014.





University of Zagreb

PHYSICS DEPARTMENT

FACULTY OF SCIENCE

Hrvoje Brkić

**COMPUTATIONAL STUDIES OF IRON  
DEPENDENT DIOXYGENASES**

DOCTORAL THESIS

Supervisor:

Sanja Tomić, PhD, Professor

ZAGREB, 2014.



## ZAHVALE

Zahvalio bih se najprije mentorici prof. dr. sc. Sanji Tomić, na zaista velikom zalaganju i trudu tijekom izrade ove disertacije. Jako je teško pronaći osobu koja će nesebično pomoći u bilo kojem trenutku, čak odvojiti i svoje slobodno vrijeme, zato zaista dugujem jedno veliko i iskreno HVALA na svojoj pomoći u svim segmentima izrade ovoga rada.

Također bih želio izdvojiti ljude uz čiju su pomoć izvedeni računi u radovima na kojima se zasniva ova disertacija, ponajprije prof. dr. sc. Michaelu Rameku sa Tehničkog sveučilišta u Grazu, za pomoć pri razvoju parametara za željezo te dr. sc. Borislavu Kovačeviću sa Instituta Ruđer Bošković za pomoć pri kvantno mehaničkim računima utvrđivanja tijeka katalitičke reakcije. Osim toga zahvalio bih i prof. dr. sc. Grit Straganz na eksperimentalnim rezultatima za koje smo tražili teorijska pojašnjenja.

Također bih zahvalio kolegicama Marini Grabar-Branilović i Antoniji Tomić na pomoći pri upoznavanju sa korisničkim sučeljima programa za izvođenje računa te ustupanju računalnih resursa.

Svojoj matičnoj instituciji Medicinskom Fakultetu u Osijeku zahvaljujem na plaćenim troškovima poslijediplomskog studija te svom šefu prof. dr. sc. Dariju Faju na ustupljenom slobodnom vremenu za učenje i pisanje disertacije.

Na kraju želio bih zahvaliti svojoj obitelji, supruzi, sinu i roditeljima na razumijevanju zbog odsutnosti i nedovoljnog vremenu koje sam posvetio njima tijekom izrade ove disertacije.





# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Fizički odsjek

Doktorski rad

## SAŽETAK

### PROUČAVANJE DIOKSIGENAZA OVISNIH O ŽELJEZU RAČUNALNIM METODAMA

*Hrvoje Brkić*

Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Tema ove doktorske disertacije je teorijsko proučavanje dioksigenaza, enzima koji pomoću iona željeza kataliziraju ugradnju oba atoma iz molekule kisika u supstrat. Proučavana su dva enzima Acetilaceton dioksigenaza iz *Acinetobacter Jonsoii* (Dke1) te ljudska 3,4-dioksigenaza 3-hidroksiantranilne kiseline (3HAO). Trodimenzionalne strukture navedenih enzima, određene rendgenskom strukturnom analizom i pohranjene u PDB bazi, korištene su kao ishodište pri modeliranju. Parametri koji nedostaju u AMBER polju sila (raspodjela naboja na ionu željeza i ligandima koji ga koordiniraju, duljine veza, iznosi kutova te pripadajuće barijere), a nužni su za simulacije, određeni su kvantno mehaničkim računima (QM) na sustavu Dke1 a uspješno su primijenjeni i na 3HAO sustavu. Stabilnost i ponašanje enzima u približno fiziološkim uvjetima proučeni su primjenom empirijskih metoda molekulskog modeliranja. Tim pristupom je analizirana stabilnost sustava, zastupljenost molekula vode u aktivnom mjestu, mreža vodikovih veza, interakcije pojedinih aminokiselinskih ostataka tijekom simulacija, njihovi srednji kvadratni pomaci tj. fluktuacije te putevi ulaska/izlaska molekula vode, reaktanata, produkata i metalnog kofaktora u enzim... Dana su teorijska pojašnjenja smanjene katalitičke aktivnosti enzima, promjene u transportu metala, molekula vode, supstrata i reaktanata do aktivnog mjesta enzima te promijene međusobnih interakcija aminokiselinskih ostataka uslijed točkastih mutacija. Pomoću QM računa utvrđen je reakcijski mehanizam na modelnom sustavu, a pomoću hibridnog kvantno mehaničkog-molekulsko mehaničkog (QM/MM) računa taj je mehanizam potvrđen u realnom okruženju enzima.

(117 stranica, 52 slika, 29 tablica, 102 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici za fiziku Prirodoslovno matematičkog fakulteta u Zagrebu, Bijenička cesta 32

Ključne riječi: metaloenzimi, molekulska dinamika, polje sila, semiempirijski računi, kvantno mehanički računi, diketon dioksigenaza, 3,4-dioksigenaza 3-hidroksiantranilne kiseline

Mentor: Prof. dr. sc. Sanja Tomić, zn. savj., IRB

Ocjenitelji: dr. sc. Borislav Kovačević, viši znanstveni suradnik, IRB  
Prof. dr. sc. Sanja Tomić, znanstveni savjetnik, IRB  
Prof. dr. sc. Nenad Pavin, PMF

Rad prihvaćen 11. 03. 2014.g.



# BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Physics

Doctoral Thesis

## ABSTRACT

### COMPUTATIONAL STUDIES OF IRON DEPENDENT DIOXYGENASES

*Hrvoje Brkić*

Medical school, J. J. Strossmayer University in Osijek

Subject of this doctoral thesis is theoretical study of dioxygenase, non-hem iron dependent enzymes that incorporate both molecular oxygen atoms into substrate. Two enzymes were studied: Acetylacetone dioxygenase from *Acinetobacter Johnsonii* (*Dke1*), and human 3,4-dioxygenase of 3-hydroxyanthranilic acid (*3HAO*). Three dimensional structures of these enzymes, determined by x-ray crystallography and stored to the Protein Data Bank ([www.ebi.ac.uk/pdbe](http://www.ebi.ac.uk/pdbe); codes 3BAL and 2QNK respectively), were used as starting points in the molecular modelling. Parameters required in MD simulations of the systems, but missing in the AMBER force field (i.e. charge distribution on iron ion and coordinating residues, bond lengths, angles, dihedrals and their barriers), were determined using quantum mechanical (QM) calculations. Stability and behaviour of the enzymes in nearly physiological conditions were studied by applying empirical methods of molecular modelling. Results of these simulations revealed: water population in the active site, hydrogen bond networks, amino acid residues interactions, protein flexibility... Besides, the pathways for trafficking different ligands (water, reactants, products and metal cofactor) from the enzyme environment to the active site were determined. Impact of point mutations to the hydrogen bond network and to the active site water accessibility was determined in *Dke1*. The reduced enzyme activity of the mutants was studied in correlation with trafficking of the metal ion, water, substrate and reactants to the enzyme active site, as well as in correlation with the amino acid residues interactions. Using hybrid quantum-mechanics/molecular-mechanics (QM/MM) calculations the reaction mechanism for *3HAO* was determined. On the basis of the MD results, we proposed explanation of the reduced enzyme activity of the mutants.

(117 pages, 52 figures, 29 tables, 102 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Physical Library, Faculty of Science in Zagreb, Bijenička cesta 32  
Keywords: metalloenzymes, molecular dynamics, force field, semiempirical calculations, quantum mechanical calculations, diketon dioxygenases, dioxygenase of 3-hydroxyanthranilic acid, dioxygenase reaction mechanism, quantum mechanics/molecular mechanics calculations

Supervisor: Sanja Tomić, PhD Professor, Scientific Advisor, IRB

Ocjenitelji: Borislav Kovačević, PhD, Senior research associate, IRB  
Sanja Tomić, PhD Professor, Scientific Advisor, IRB  
Nenad Pavin, PhD Professor, PMF

Thesis accepted March 11<sup>th</sup>, 2014



# SADRŽAJ

|   |    |
|---|----|
| 1. UVOD   | 1  |
| 1.1. Biološki sustavi   | 1  |
| 1.1.1. Acetilaceton dioksigenaza iz <i>Acinetobacter</i> Jonsoii (Dke1)             | 2  |
| 1.1.2. 3,4-dioksigenaza 3-hidroksiantranilne kiseline (3HAO)                        | 6  |
| 1.2. Računalne metode   | 8  |
| 1.2.1. Empirijske metode  | 9  |
| 1.2.2. Kvantno mehaničke metode   | 18 |
| 1.2.3. Kombinirane kvantno mehaničke-molekulske mehaničke metode                    | 21 |
| 1.2.4. Semiempirijske metode  | 23 |
| 1.2.5. Ostale računalne metode  | 23 |
| 1.2.5.1. MM-PBSA  | 23 |
| 1.2.5.2. Metoda uklapanja   | 24 |
| 1.2.5.3. Ptraj  | 26 |
| 1.2.5.4. Caver  | 26 |
| 1.2.5.5. GRID   | 26 |
| 1.2.5.6. VMD  | 27 |
| 1.3. Predmet i cilj disertacije   | 27 |
| 2. METODE   | 28 |
| 2.1. Acetilaceton dioksigenaza iz <i>Acinetobacter</i> Jonsoii (Dke1)               | 28 |
| 2.1.1. Razvoj parametara za željezo   | 28 |
| 2.1.2. MD simulacije; prirodni protein u kompleksu s ligandom                       | 29 |
| 2.1.2.1. MD simulacije kompleksa s mutiranim enzimom                                | 31 |
| 2.1.3. Simulacije izbacivanja supstrata (reaktanata i produkata) iz aktivnog mjesta | 32 |
| 2.1.4. GRID računi: utvrđivanje mogućih niskoenergijskih položaja za O <sub>2</sub> | 34 |
| 2.1.5. Računi slobodne energije vezanja hidratiziranog Fe <sup>2+</sup> za enzim    | 34 |
| 2.1.6. Strukturne analize   | 34 |
| 2.2. 3,4-dioksigenaza 3-hidroksiantranilne kiseline (3HAO)                          | 35 |
| 2.2.1. Parametrizacija i MD simulacije  | 35 |
| 2.2.2. QM i QM/MM računi  | 36 |
| 3. REZULTATI  | 39 |
| 3.1. Acetilaceton dioksigenaza iz <i>Acinetobacter</i> Jonsoii (Dke1)               | 39 |
| 3.1.1. Određivanje parametara za MD simulacije                                      | 39 |
| 3.1.2. Simulacija nativnog proteina i njegovog kompleksa s 2,4-pentandionom         | 45 |

|          |   |     |
|----------|---|-----|
| 3.1.2.1. | Prva koordinacijske sfera i hidrofilna trijada . . . . .  | 45  |
| 3.1.2.2. | Kanali za molekule vode . . . . .   | 50  |
| 3.1.3.   | Kompleks Dke1 sa supstratom . . . . .   | 51  |
| 3.1.3.1. | Prva koordinacijska sfera i hidrofilna trijada . . . . .  | 52  |
| 3.1.3.2. | Kanali za molekule vode i zaposjednutost neposredne<br>okolice $\text{Fe}^{2+}$ molekulama vode . . . . . | 56  |
| 3.1.3.3. | Fleksibilnost proteina . . . . .  | 57  |
| 3.1.4.   | Kompleksi mutanata Dke1 s PD . . . . .  | 57  |
| 3.1.4.1. | Prva koordinacijska sfera i hidrofilna trijada u kompleksima s<br>mutantima . . . . .                     | 59  |
| 3.1.4.2. | Rezultti GRID računa . . . . .  | 61  |
| 3.1.4.3. | Izbacivanje liganda iz aktivnog mjesta enzima . . . . .   | 63  |
| 3.1.5.   | Simulacije sa hidrofilnim mutantima . . . . .   | 65  |
| 3.1.5.1. | MD simulacije s apo enzimima . . . . .  | 65  |
| 3.1.5.2. | MD simulacije sa $\text{Fe}^{2+}$ vezanim u aktivno mjesto . . . . .                                      | 65  |
| 3.1.5.3. | Simulacije na sustavima sa vezanim PD . . . . .   | 66  |
| 3.1.5.4. | Odlazak $\text{Fe}^{2+}$ iz aktivnog mjesta . . . . .   | 67  |
| 3.1.5.5. | Ulazak $\text{Fe}^{2+}$ u protein . . . . .   | 74  |
| 3.2.     | 3,4-dioksidgenaza 3-hidroksiantranilne kiseline (3HAO) . . . . .  | 76  |
| 3.2.1.   | Vezanje supstrata za 3HAO i njegov utjecaj na strukturu i<br>dinamička svojstva proteina . . . . .        | 76  |
| 3.2.2.   | Uticaj točkastih mutacija na strukturu, dinamička i<br>termodinamička svojstva kompleksa . . . . .        | 80  |
| 3.2.3.   | Modeliranje enzimatske reakcije . . . . .   | 84  |
| 3.2.3.1. | Kvantno mehanički računi . . . . .  | 84  |
| 3.2.3.2. | Kombinirani QM/MM računi . . . . .  | 88  |
| 4.       | RASPRAVA . . . . .  | 93  |
| 5.       | ZAKLJUČAK . . . . .   | 99  |
| 6.       | DODATCI . . . . .   | 101 |
| 6.1.     | DODATAK A – Tablice . . . . .   | 101 |
| 6.2.     | DODATAK B – Slike . . . . .   | 105 |
| 6.3.     | DODATAK C – Kratice . . . . .   | 108 |
| 7.       | Popis literature . . . . .  | 110 |
|          | ŽIVOTOPIS AUTORA S POPISOM OBJAVLJENIH RADOVA . . . . .   | 116 |







# 1. UVOD

## 1.1. Biološki sustavi

Predmet proučavanja ove doktorske disertacije su dioksigenaze, enzimi koji u svom aktivnom mjestu (mjestu gdje dolazi do kemijske reakcije) sadrže dikation željeza. Istraživanja smo proveli koristeći računalne metode molekulskog modeliranja različitog stupnja složenosti. Na taj smo način uspjeli pojasniti neke eksperimentalne rezultate te dobiti odgovore na pitanja izvan dosega eksperimentalnih istraživanja.

Dioksigenaze kataliziraju vezanje oba atoma iz atmosferskog molekularnog kisika na reaktant. Imaju važnu ulogu u biosintezi, transformaciji i degradaciji esencijalnih metabolita, kao što su aminokiseline, lipidi, šećeri, nukleinske kiseline, porfirini, vitamini i hormoni te u degradaciji različitih aromatskih spojeva, kao što su lijekovi, insekticidi i neki kancerogeni spojevi [1]. Željezo ( $\text{Fe}^{2+}$ ) u aktivnom mjestu ovih enzima nije sastavni dio hem skupine te je kao takvo slabije istraženo. Važnost proučavanja željeza proizlazi iz njegove sveprisutnosti u živim organizmima. Naime gotovo svi živući organizmi sadrže željezo, a njegovo je uzimanje iz okoline jedan od važnijih metaboličkih procesa kod većine organizama [2]. Vrlo visoka primjena željeza u svim živućim organizmima, pripisuje se njegovoj dostupnosti u počecima života na Zemlji [3]. Glavna funkcija većine dioksigenaza je iskorištavanje oksidacijskog potencijala  $\text{O}_2$ , pri čemu se  $\text{Fe}^{2+}$  koristi za njegovu aktivaciju, a korištenje  $\text{Fe}^{2+}$  veznih mjesta najčešći je mehanizam za rješavanje kinetičkih problema aktivacije  $\text{O}_2$  u prirodi. Razumijevanje evolucijske implementacije  $\text{Fe}^{2+}$  u različite biološke funkcije se sve više razvija zahvaljujući razvoju spektroskopije, kristalografije, enzimske kinetike te metoda računalnog modeliranja.

Ne-hem željezni kompleksi s proteinima gotovo uvijek sadrže željezo visokog spina [3]. Vezno je mjesto željeza u dioksigenazama uglavnom i katalitičko mjesto, a prijenos elektrona s dvovalentnog kationa željeza na molekulu kisika se događa u prisutnosti supstrata. Razlika u stanju spinova između molekularnog kisika ( $\text{O}_2$ ) i većine organskih spojeva čini organske spojeve vrlo inertnima u reakcijama sa  $\text{O}_2$ . Sposobnost  $\text{Fe}^{2+}$  da preko inicijalne aktivacije molekule kisika, snizi barijeru u reakcijama s organskim spojevima čini ga glavnim sudionikom u transformaciji organskih molekula kod živućih sustava [3]. Dinamička svojstva aktivnog mjesta su također bitna za tijek reakcije. Konformacijske promjene, uključujući izmjenu liganada, kontroliraju koordinacijsko okruženje metala i dozvoljavaju generiranje

veznih mjesta za supstrate. U biološkim sustavima svojstvo željeznog iona da se pomiče znatno sporije od ostalih iona u aktivnom mjestu [3] može imati značajnu ulogu za steričku kontrolu katalize. Koordinacija željeza kod ne-hem proteina pokazuje značajnu fleksibilnost i odstupanja od simetrične oktaedarske strukture, s otvorenim koordinacijskim mjestima za vezanje liganada. Kod dioksigenaza  $\text{Fe}^{2+}$  je najčešće koordiniran s dva histidina (His) i jednim glutamatom (Glu), no vrlo su česta odstupanja od takve koordinacije. Ključnu ulogu u stabilizaciji aktivnog mjesta sa željeznim ionom imaju histidinski aminokiselinski ostatci koji ostaju u koordinacijskoj sferi željeznog iona, bez obzira na promjene njegovog oksidacijskog broja. Histidini imaju vrlo nisku fleksibilnost i obično ne sudjeluju u stabilizaciji supstrata dok karboksilne skupine glutamata, osim što koordiniraju željezo, imaju i ključnu ulogu pri stabilizaciji reaktanata i međuprodukata.

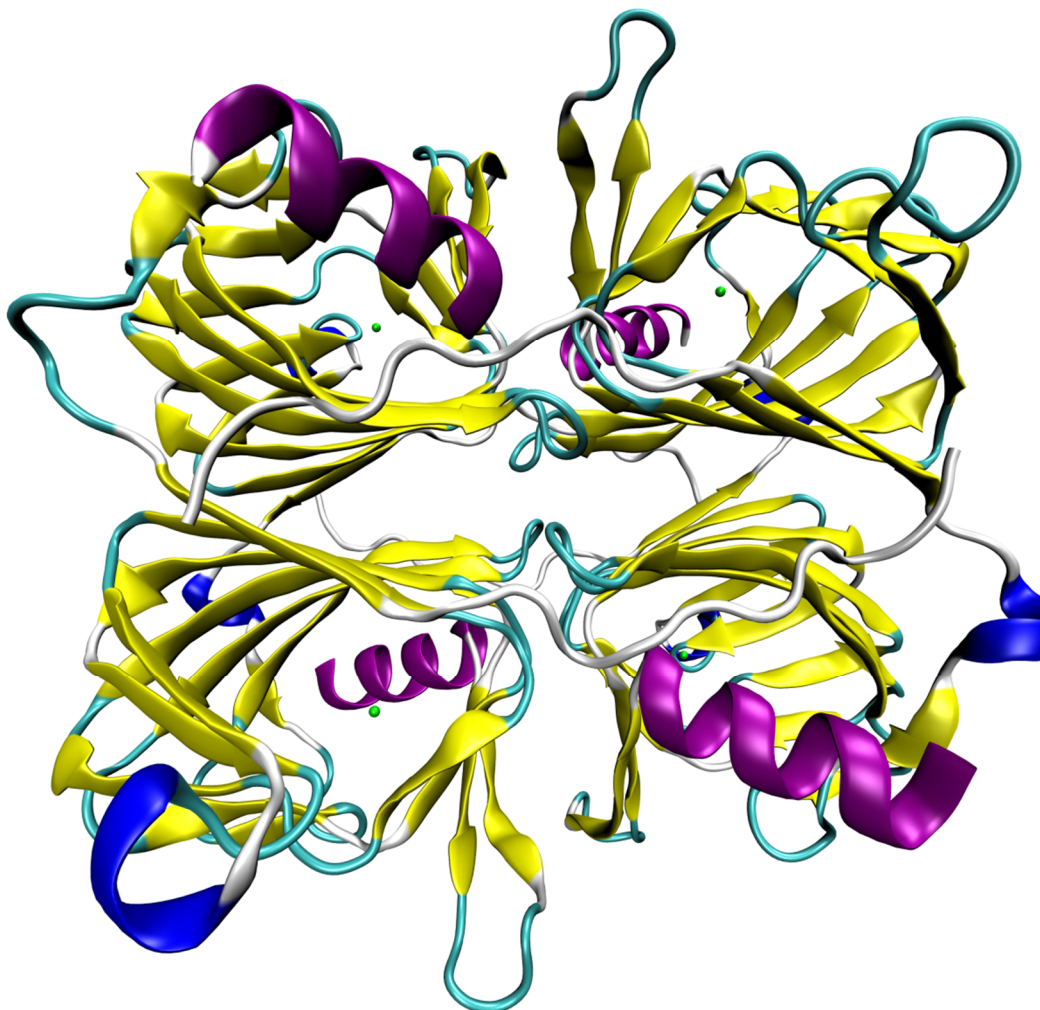
#### 1.1.1. Acetilaceton dioksigenaza iz *Acinetobacter Jonsoii* (Dke1)

U radu su istražena dva enzima, dioksigenaze s ionom željeza u aktivnom mjestu, od kojih je prva Acetilaceton dioksigenaza iz *Acinetobacter Jonsoii* (Dke1, slika 1.1. i 1.2.). Dke1 se još naziva i dioksigenaza za cijepanje diketona (molekula s dvije keto funkcionalne skupine). U ovoj je disertaciji proučavano vezanje diketona acetilacetona (2,4 pentandiona (PD)) na metalni ion u enzimu Dke1 (Slika 1.3.).

Dke1 je izoliran iz *Acinetobacter Jonsoii*, koja se nalazi u kanalizacijskom sustavu, a posjeduje sposobnost rasta na acetilacetonu, kao jedinom izvoru ugljika [4]. Postoje naznake da bi ovaj enzim mogao biti široko rasprostranjen među mikroorganizmima, budući da su slični geni izolirani u uzorcima iz Sargaškog mora [5], koje je zbog svoje specifičnosti vrlo važan i zanimljiv ekosustav.

PD je služio kao aromatski dodatak hrani, sve dok nije otkriveno da je genotoksičan, odnosno da ima štetno djelovanje na stanični genetski materijal. Stoga je odlukom europske komisije zabranjeno njegovo korištenje kao dodatka hrani [6]. Osim preko hrane, do izlaganja acetilacetonu može doći i inhalacijom zraka koji sadrži pare acetilacetona, zatim unosom zagađene vode u organizam te preko kože u dodiru s tvarima koje ga sadrže. U prirodu može doći iz različitih izvora budući da se koristi kao dodatak gorivima, mazivima, kao sušilo za boje, lakove i tinte za tonere, a nekada se koristio i kao fungicid, baktericid, sredstvo za očuvanje drveta i insekticid. Vrijeme poluraspada u prirodi mu je 14-16 dana, ovisno o sredstvu u kojem je prisutan. Zbog visoke toksičnosti i štetnosti za organizam, poznavanje

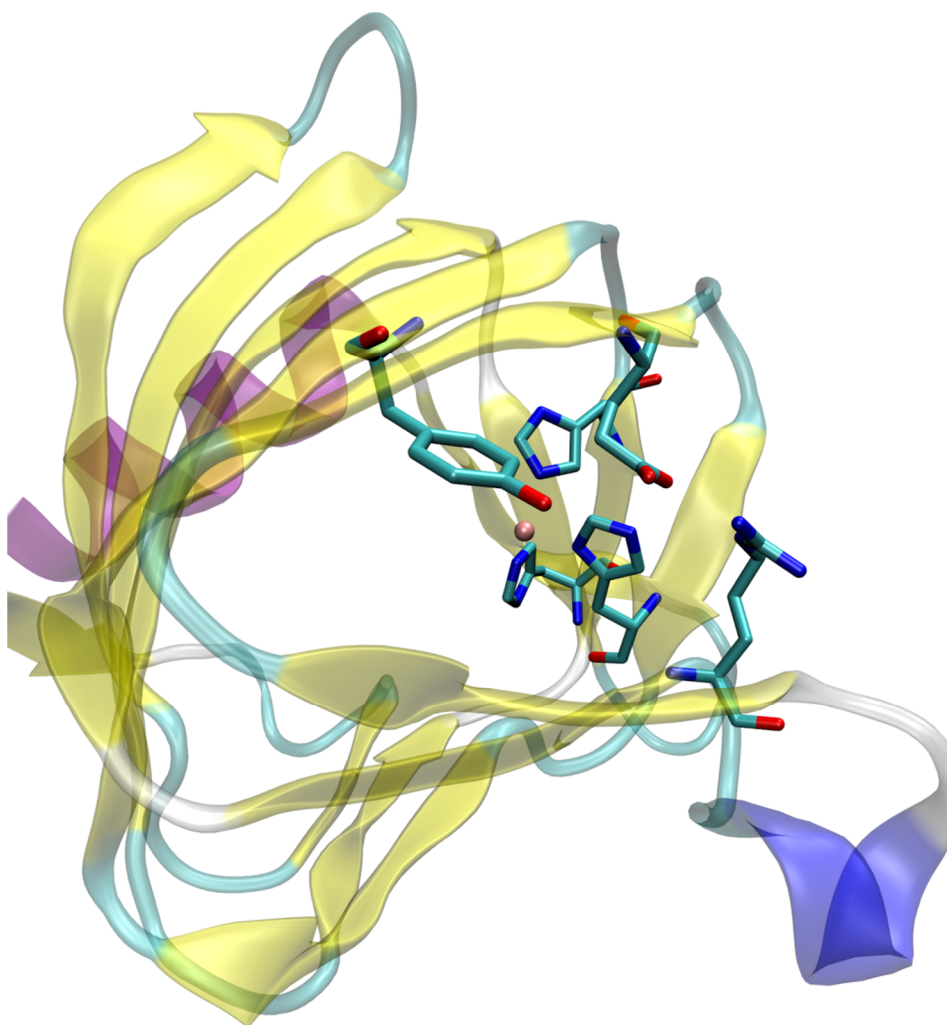
mehanizma njegove razgradnje od velikog je značaja, a vezano s tim i poznavanje mehanizma djelovanja enzima Dke1.



**Slika 1.1.** Diketon dioksigenaza (tetramer) u vrpčastoj reprezentaciji. Ioni željeza u monomernim jedinicama prikazani su zelenim kuglicama.

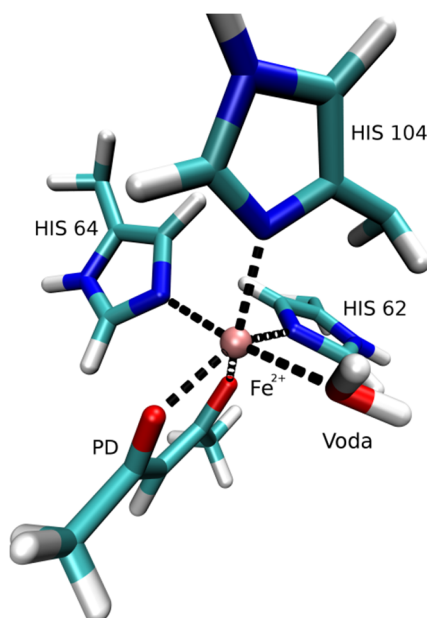
Dke1 je o  $\text{Fe}^{2+}$  ovisan enzim koji pretvara 2,4-pentandion i  $\text{O}_2$  u metilglikoksal (MG) i acetat (AC) [7]. Produkti katalize acetalcetona se dalje razgrađuju, a studije s  $^{18}\text{O}$  kao biljekom upućuju na to da se svaki atom kisika ugrađuje u jedan od produkata katalize [8]. Dke1 je dioksigenaza male supstratne specifičnosti koja efikasno katalizira oksidativnu degradaciju beta-dikarbonil spojeva [7, 4] (kao što su diketoni). Utvrđeno je da se rastom *Acinetobacter Jonsoii* na acetalcetonu, dobije molni iznos acetata proporcionalan potrošnji molekularnog kisika [6]. Budući da je brzina redukcije kisika direktno korelirana s aktivnošću enzima moguće je iz potrošnje  $\text{O}_2$  direktno mjeriti brzinu reakcije [9].

U aktivnom je obliku enzim organiziran u homotetramer (slika 1.1.) s monomerom oblika beta bačvice (slika 1.2.), koji se sastoji od 153 aminokiselinska ostatka [10]. Eksperimentalnim je istraživanjima utvrđeno da je metalni kofaktor u svakoj monomernoj jedinici Dke1 koordiniran aminokiselinskom trijadom His62, His64 i His104 (slika 1.3.) te da je za aktiviranje kisika, osim navedenih histidina, nužno vezanje supstrata u aktivno mjesto [11]. Vezanje drugih metalnih iona kao  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  i  $\text{Cu}^{2+}$ , koji u nekim reakcijama mogu zamijeniti  $\text{Fe}^{2+}$  u aktivnom mjestu Dke1, u potpunosti su deaktiviraju enzim. U aktivnom mjestu eksperimentalno određene strukture Dke1 (PDB kod 3BAL) nalazi se ion cinka.



**Slika 1.2.** Monomer Dke1. Ion željeza prikazan je roza kuglicom, koordinirajući histidini i aminokiselinski ostatci tzv. katalitičke trijade (Tyr70, Arg80 i Glu98), koji tvore mrežu vodikovih veza, koja je prema istraživanjima [12] bitna za aktivnost enzima, prikazani su štapićima, dok je ostatak monomera prikazan vrpčama.

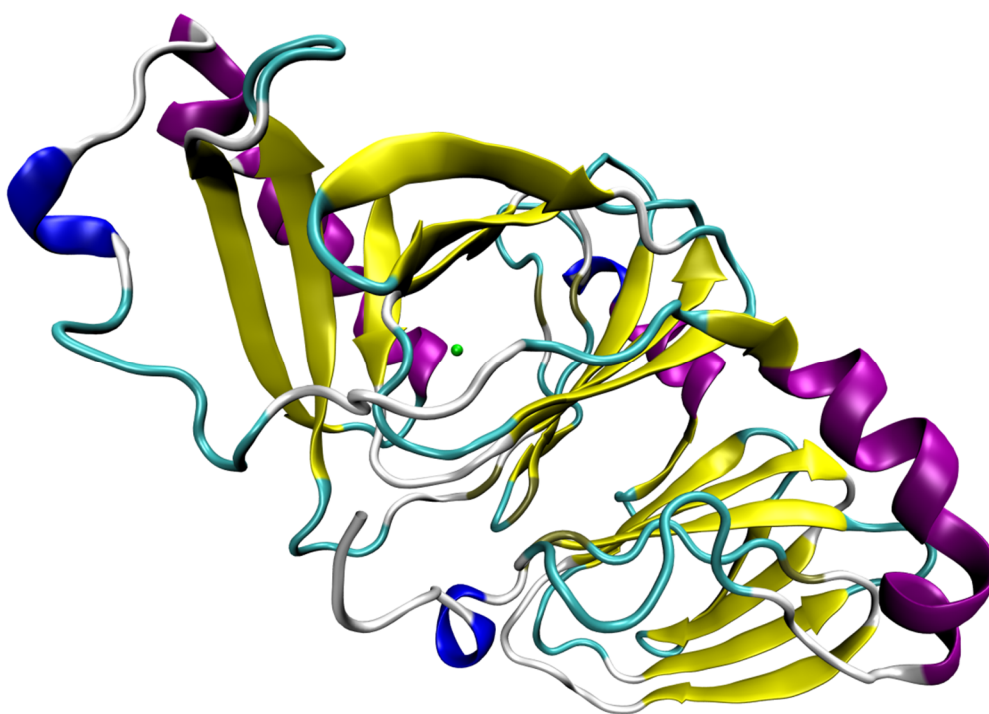
U dosadašnjim istraživanjima također je pokazano da Dke1 aktivira  $O_2$  na isti način kao i neke druge  $Fe^{2+}$  dioksigenaze, koje najčešće dolaze kao monomeri [13, 14]. Rezultati kinetičkih analiza na nizu točkastih mutanata Dke1 upućuju na povezanost redukcije  $O_2$  s mrežom vodikovih veza u veznom mjestu supstrata [15] te na to da posebnu ulogu u formiranju mreže vodikovih veza imaju aminokiselinski ostatci Tyr70, Arg80, Glu98 i Thr107. Do sada su predložena dva pojašnjenja smanjene katalitičke aktivnosti mutanata. Prvo se temelji na nužnosti pravilne orijentacije vodikovih veza između aminokiselinskih ostataka Tyr70, Arg80 i Glu98, za koje se pretpostavlja da stabiliziraju prijelazno stanje reakcije i negativni naboj na superoksidu,  $O_2^-$ , koji nastaje tijekom reakcije i nužan je za razgradnju acetilacetona. Prema drugom je pojašnjenju smanjena aktivnost enzima posljedica negativnog utjecaja molekula vode u aktivnom mjestu koje uslijed mutacija lakše dolaze do metalnog iona te vezanjem na  $Fe^{2+}$  onemogućuju vezanje molekule kisika. Naime, navedene aminokiseline tvore „hidrofilna vrata“ do aktivnog mjesta, a njihovom mutacijom enzimska aktivnost se smanjuje 50-100 puta. Zamjenom aminokiselinskog ostatka Thr107, koji se nalazi u vanjskoj koordinacijskoj sferi molekula, dolazi do gubitka  $Fe^{2+}$ , razlog tomu bi mogla biti njegova povećana hidratizacija. Mutacija Glu98 koji je također u drugoj koordinacijskoj sferi molekule, ne dovodi do gubitka  $Fe^{2+}$ , već rezultira njegovim bržim vezanjem za enzim.



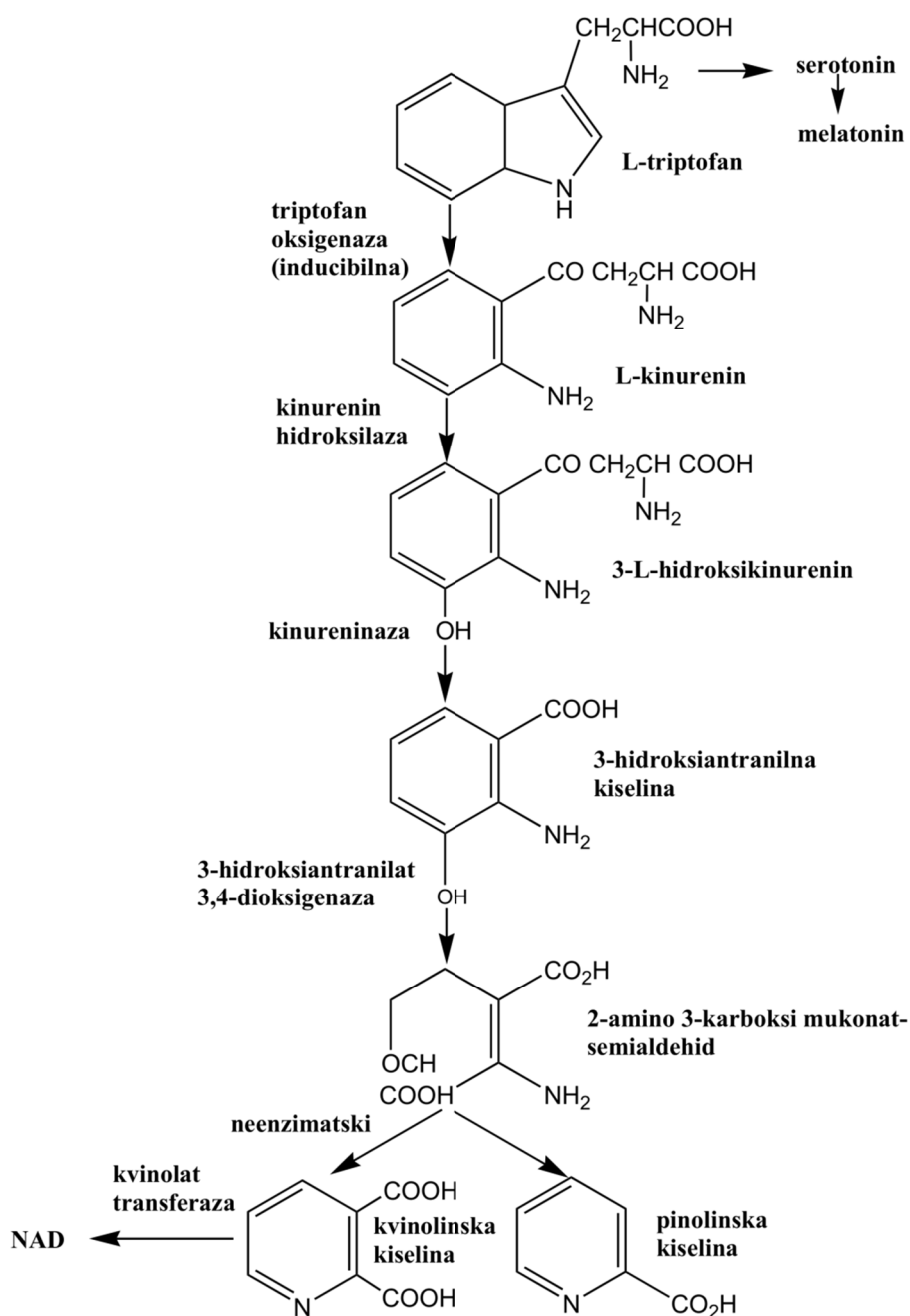
**Slika 1.3.** Aktivno mjesto enzima Dke1 s vezanim supstratom. Željezni ion je prikazan ružičastom kuglicom, a ligandi željeza: supstrat, histidini i molekula vode štapićima. Isprekidanim crnim linijama su prikazane udaljenosti željeza i atoma liganada s kojima je povezan (smatra se da neki atom koordinira metalni ion ako je njihova udaljenost manje od 2,5 Å).

### 1.1.2. 3,4-dioksidgenaza 3-hidroksiantranilne kiseline (3HAO)

Druga, u ovoj disertaciji proučavana dioksidgenaza je ljudska 3,4-dioksidgenaza 3-hidroksiantranilne kiseline (3HAO, EC 1.13.11.6 slika 1.4.). 3HAO je citosolni protein koji se sastoji od 286 aminokiselinskih ostataka [17], organiziranih u monomer. Kristalna struktura ljudske 3HAO je dostupna u PDB-bazi pod kodom 2QNK [18]. Ovaj je enzim važan dio kinureninskog puta, koji dovodi do degradacije triptofana i formiranja nikotin amid dinukleotida ( $\text{NAD}^+$ ). 3HAO katalizira cijepanje benzenskog prstena 3-hidroksiantranilne kiseline, međuprodukta kinureninskog puta, a kao produkt daje kvinolinsku kiselinu, zbog čega ima važnu ulogu u poremećajima vezanim uz razinu te kiseline u tkivu [19]. Kinureninski put (shema 1.1.) je povezan s važnim biološkim učincima kao što su san, ponašanje, termo regulacija i trudnoća. Osim toga, on predstavlja glavni način metabolizma L-triptofana, a odvija se u većini vrsta stanica: astrociti, makrofagi, neuroni, oligodendrociti i endotelne stanice. U tijelu se triptofan prenosi kroz periferne organe na dva načina: vezan za albumin (90%) ili u slobodnom obliku (10%) [20], pri čemu samo slobodni oblik može iz krvi preći u mozak.



**Slika 1.4.** 3,4-Dioksidgenaza 3-hidroksiantranilne kiseline prikazana u vrpčastoj reprezentaciji s ionom željeza kao zelenom kuglicom.



**Shema 1.1.** Kinureninski put, preuzeto i prerađeno iz *Harper i sur.* [21]

Proces razgradnje L-triptofana započinje njegovom oksidacijom, koju mogu katalizirati tri enzima TDO, IDO-1 i IDO-2. Prvi stabilni produkt reakcije je L-kinurenin, od kojeg posredstvom kinurenin-hidroksilaze nastaje 3-L-hidroksikinurenin. Dalje, uz pomoć kinureninaze, nastaje 3-hidroksiantranilat, koji posredstvom ovdje proučavanog enzima, daje 2-amino 3-karboksi mukonat-semialdehid koji se neenzimatski raspada na kvinolinsku kiselinu.

U posljednjem koraku kinureninskog puta uz pomoć kvinolat transferaza nastaje NAD (shema 1.1.).

Poremećaji u kinureninskom putu su implicirani u cijelom nizu bolesti i poremećaja koje uključuju infektivne bolesti (kao npr. HIV), neurološke bolesti (npr. Alzeheimerova i Hungtingtonova bolest), afektivne poremećaje (shizofrenija, depresija, anksioznost), autoimune bolesti (multipla skleroza i reumatski artritis), kardiovaskularne i maligne bolesti. S obzirom na to jasno je da proučavanje 3HAO ima vrlo važnu ulogu u doprinosu razumijevanja fizioloških procesa.

3HAO je široko rasprostranjen u perifernim organima, kao što su jetra i bubrezi, a prisutan je i u središnjem živčanom sustavu [22]. Pored strukture humanog 3HAO, poznate su kristalne strukture bakterijskog i goveđeg enzima (PDB kod 1YFY odnosno 3FE5). Kako bi se utvrdio mehanizam djelovanja 3HAO enzima eksperimentalno je proučeno nekoliko njegovih mutanta [23]. Inaktivacija enzima pomoću 4-kloro,3-hidroksiantranilata pojašnjena je EPR („Electron Proton Resonance“) mjerenjima [24]. Nadalje, EPR studijama potvrđeno je da nakon ugradnje  $O_2$  u supstrat, željezo ostaje u aktivnom mjestu, i prelazi iz  $Fe^{2+}$  u  $Fe^{3+}$  stanje. Ukoliko se molekula kisika ne ugradi u supstrat (kao u slučaju 4-kloro,3-hidroksiantranilata), željezo ostaje u stanju  $Fe^{3+}$  što rezultira inaktivacijom enzima. S ciljem pronalaska boljih inhibitora, određena je relacija strukture i aktivnosti postojećih (QSAR) [25]. Za 3HAO enzim do sada, prema našoj spoznaji, nije rađeno molekulsko modeliranje, niti je kvantno mehanički utvrđen tijek same reakcije.

## 1.2. Računalne metode

Istraživanja na enzimima pomoću računalnih metoda provode se gotovo 4 desetljeća [26], a posljednjih nekoliko godina bilježe eksponencijalni razvoj, ponajprije zahvaljujući naglom razvoju računala i njihovoj širokoj dostupnosti. Molekulsko modeliranje obuhvaća niz metoda kojima se oponaša i proučava ponašanje realnih molekula i molekulskih sustava. Ono pruža informacije o dinamičkim svojstvima enzima, utjecaju supstrata na ta svojstva, načinu vezanja liganda, o vodikovim vezama unutar enzima, utjecaju otapala na strukturu molekule i brzinu reakcija te o čitavom nizu strukturnih i fizikalno-kemijskih svojstava proteina. Kako bi se što potpunije razumjelo djelovanje enzima koriste se metode modeliranja različitog stupnja složenosti: empirijske, semiempirijske, kvantno mehaničke (QM) i kombinirane kvantno mehaničke-molekulsko mehaničke (QM/MM).



Tijekom posljednjih desetljeća bilježi se značajno poboljšanje empirijskih metoda pa time i razvoj parametara za metalne ione koji su sastavni dio enzima. Ti parametri uvelike ovise o okolišu metalnog iona i najčešće se određuju pomoću QM metoda [27]. Do sada su dobro poznati parametri za željezo koje je sastavni dio hem skupine, ali ne i za željezo u oksigenazama koje proučavamo, pa je razvoj tih parametara bio jedan od zadataka ove disertacije.

Kao polazne strukture za računalne simulacije korištene su difrakcijom X-zraka određene strukture acetilaceton dioksigenaze iz *Acinetobacter Jonsoii* i 3,4-dioksigenaze 3-hidroksiantranilne kiseline, dostupne u PDB proteinskoj bazi podataka pod kodovima 3BAL i 2QNK.

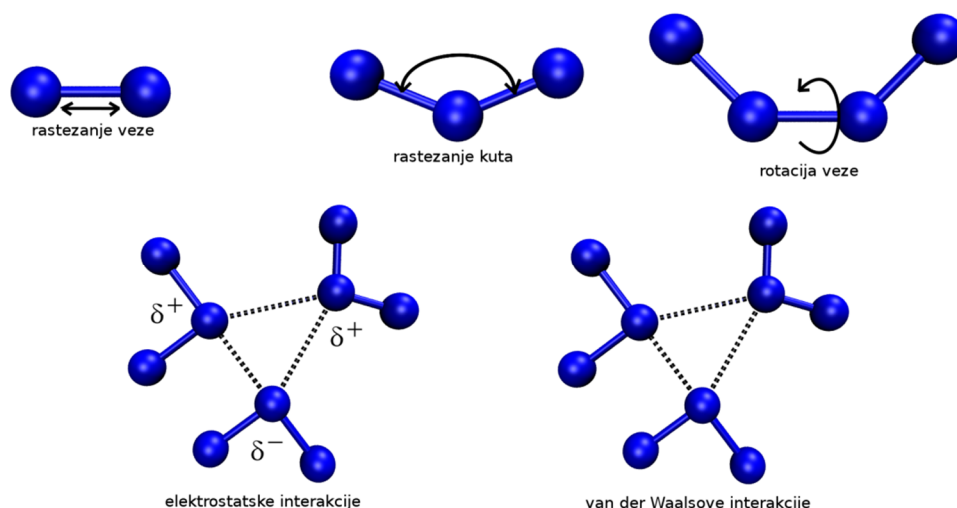
### 1.2.1. Empirijske metode

Empirijske metode modeliranja ne zadiru u elektronsku strukturu atoma, a nazivaju se još i metode polja sila. U ovim se metodama zanemaruju elektronska gibanja, a energija sustava se računa samo kao funkcija položaja jezgri te su računi znatno brži od QM. Koriste se ponajviše za sustave koji imaju značajno veliki broj atoma, a u nekim je slučajevima njihova točnost usporediva s onom kod QM metoda. U empirijske se metode ubrajaju metode molekulske mehanike (MM), molekulske dinamike (MD) te Monte Carlo metode. Pretpostavka navedenih metoda je dobro definirano polje sila koje je skup parametara i matematičkih funkcija koje se koriste za opis potencijalne energije sustava čestica.

U slučaju korištenja polja sila za sve atome (*engl.* all atom force field) svaki se pojedini atom razmatra kao zasebna čestica kojoj je dodijeljen naboj, masa i radijus (najčešće van der Waalsov). U izrazu se za potencijalnu energiju sustava (jednadžba 1.1., slika 1.5) koriste članovi koji opisuju odstupanje veza i kutova od ravnotežnih vrijednosti te izrazi za nevezne, van der Waalsove i Coulombske, interakcije.

$$\begin{aligned}
 V = & \sum_{veze} \frac{k_i}{2} (l_i - l_{i,0})^2 + \sum_{kutovi} \frac{k_i}{2} (\theta_i - \theta_{i,0})^2 + \sum_{torzije} \frac{V_n}{2} (1 + \cos(n\omega - \gamma)) + \\
 & + \sum_{i=1}^N \sum_{j=i+1}^N \left( 4\epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \right)
 \end{aligned} \tag{1.1}$$

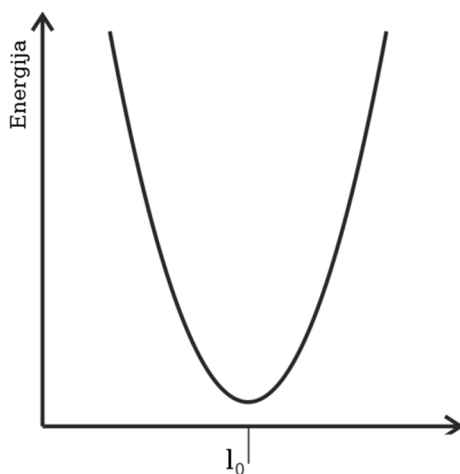
U gornjem izrazu  $V$  označava potencijalnu energiju, koja je funkcija položaja ( $\vec{r}$ )  $N$  čestica. Prvi član u gornjoj jednažbi predstavlja interakciju između parova kovalentno vezanih atoma, a ima oblik harmonijskog potencijala (slika 1.6.) i opisuje povećanje energije uslijed odstupanja duljine veza ( $l_i$ ) od ravnotežnog položaja ( $l_{i,0}$ ). Drugi član je suma svih promjena potencijalne energije sustava do koje dolazi uslijed odstupanja valentnih kutova od njihovih ravnotežnih položaja. Uvjet za primjenu ovog člana je da tri atoma budu međusobno povezana kovalentnom vezom. Treći član, oblika periodične funkcije, opisuje promjenu energije uslijed rotacije oko središnje veze 4 uzastopno kovalentno povezana atoma. Četvrti je član nevezni član potencijalne energije koji je definiran za atome različitih molekula ili za atome istih molekula ako je među njima razmak od najmanje tri kovalentne veze u nizu. Prvi dio četvrtog člana opisuje van der Waalsove interakcije preko Lennard-Jones-ovog potencijala, a drugim članom opisana je elektrostatska potencijalna energija (elektrostatske interakcije aproksimiraju se Coulombskim, dok se viši članovi izraza zanemaruju).



**Slika 1.5.** Ključni doprinosi potencijalnoj energiji sustava u aproksimaciji polja sila (vidi jednažbu 1.1., preuzeto i prerađeno [28]). Crnim su isprekidanim linijama povezani atomi čija se nevezna interakcija razmatra.

Polje sila, osim funkcije potencijalne energije molekule, odnosno sustava molekula, uključuje i atomske parametre, odnosno vrijednosti kojima opisujemo interakcije među atomima. Parametri uključuju strukturne vrijednosti kao što su ravnotežne duljine veza, valentnih, torzijskih i plošnih kutova te tzv. konstante sile, tj. visine barijera koje definiraju promjenu potencijalne energije do koje dolazi promjenom pojedinih strukturnih veličina. Nadalje, polje sila uključuje i naboje, mase i radijuse atoma. Parametri se mogu odrediti iz

eksperimentalnih podataka (npr. iz kristalne strukture i na temelju spektroskopskih mjerenja) ili iz složenijih QM računa.

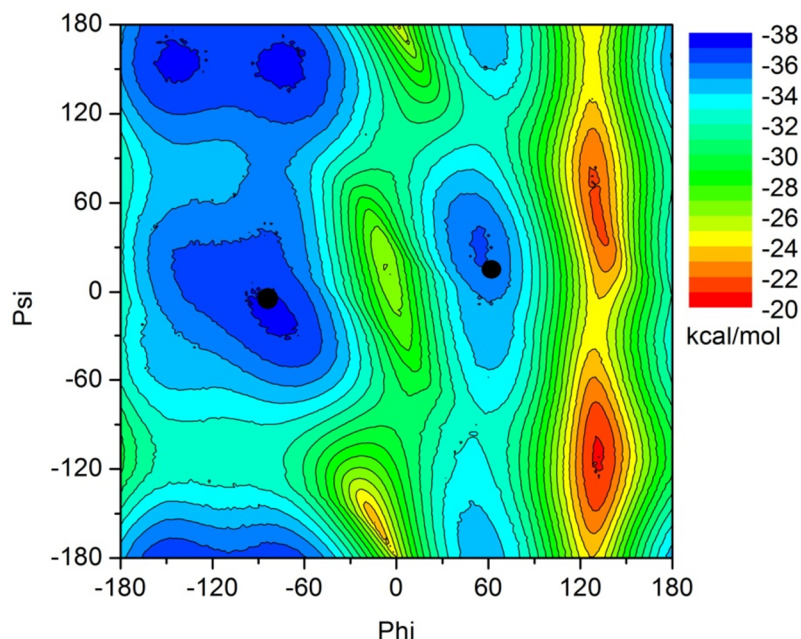


**Slika 1.6.** Oblik funkcije harmoničkog potencijala

Molekulska se mehanika ponajprije koristi za optimizaciju geometrije molekula odnosno za pronalazak minimuma energije na plohi potencijalne energije (slika 1.7.).

Stabilna stanja sustava odgovaraju lokalnim minimumima na plohi potencijalne energije (tamno plavo označena područja na slici 1.7.). Počevši od strukture koja nije uravnotežena (najčešće kristalne), optimizacijske metode matematičkim algoritmima pomiču atome na način da se ukupna sila na svaki atom smanjuje dok ona ne postane zanemariva. U disertaciji su korištene dvije metode optimizacije, metoda najbržeg silaska (*engl.* steepest descent) i metoda konjugiranih gradijenata (*engl.* conjugate gradient).

Kod metode najbržeg silaska atomi se pomiču u smjeru djelovanja sile (geografski bi to značilo hodanje nizbrdo), pri čemu je korak proporcionalan negativnom gradijentu funkcije u danoj točki. Za razliku od prethodne, smjerovi kod metode konjugiranih gradijenata nemaju oscilatorno ponašanje, a gradijent i smjer sukcesivnih koraka su ortogonalni, odnosno smjer svakog novog koraka je konjugirano ortogonalan na sve prethodne smjerove (tj. ortogonalan u smislu skalarnog produkta), pri čemu nije potrebno „pamtiti“ sve smjerove, već samo prethodni. Navedeni pristup ima svojstvo da za kvadratnu funkciju od  $n$  varijabli postiže minimum za  $n$  koraka



**Slika 1.7.** Dvodimenzionalna ploha potencijalne energije,  $E=f(\varphi,\psi)$  gdje  $\varphi$  i  $\psi$  označavaju torzijske kutove (preuzeto sa [www.ambermd.org](http://www.ambermd.org) [29])

Molekulska dinamika (MD) prati razvoj sustava u vremenu. Tijekom simulacija molekulske dinamike položaji atoma kroz određeni vremenski period računaju se pomoću Newtonovih jednadžbi (1.2.) gibanja, dok su interakcije između atoma i molekula sustava opisane izrazom za potencijalnu energiju.

$$\frac{d\vec{p}_i}{dt} = m_i \vec{a}_i = m \frac{d^2\vec{r}_i}{dt^2} \quad (1.2.)$$

Važna je pretpostavka molekulske dinamike ergodička hipoteza, koja kaže da, ukoliko sustav simuliramo dovoljno dugo vremenski prosjek nekog svojstva sustava odgovara njegovoj makroskopskoj vrijednosti, tj. prosjeku tog svojstva u statističkom ansamblu (MD se najčešće bavi kanonskim ansamblima). Početne brzine atomima u (optimiziranom) sustavu dodjeljuju se pomoću Maxwell-Boltzmannove raspodjele brzina (1.3.) prema kojoj je vjerojatnost,  $p$ , da se atom ( $i$ ) mase  $m_i$  na temperaturi  $T$  giba brzinom  $v_{ix}$  u smjeru  $x$  dana izrazom:

$$p(v_{ix}) = \sqrt{\frac{m_i}{2\pi k_B T}} e^{-\frac{m_i v_{ix}^2}{2k_B T}} \quad (1.3.)$$

Daljnje brzine atoma računaju se ovisno o silama koje u nekom trenutku na nj djeluju. Deriviranjem izraza za potencijalnu energiju ( $\vec{F} = -\frac{\partial V}{\partial \vec{r}}$ ) dobijemo silu na atome te iz drugog Newtonovog zakona akceleraciju (1.2.). Budući da je Newtonove jednadžbe potrebno riješiti za svaki atom u sustavu, problem postaje računalno složen te se jednadžbe ne rješavaju analitički već korištenjem numeričkih metoda. Najpoznatija je Verleterova [30] metoda integracije (tzv. 'Velocity Verlet' [31] metoda), koja je prilagođena generiranju trajektorija kod molekulske dinamike, no koristi se i u druge svrhe. U toj se metodi brzina i položaj računaju za istu vrijednost vremenske varijable, preko jednadžbi 1.4. i 1.5.

$$\vec{r}(t + \Delta t) = \vec{r}(t) + \vec{v}(t)\Delta t + \frac{1}{2}\vec{a}(t)(\Delta t)^2 \quad (1.4.)$$

$$\vec{v}(t + \Delta t) = \vec{v}(t) + \frac{\vec{a}(t) + \vec{a}(t + \Delta t)}{2}\Delta t \quad (1.5.)$$

Gdje  $\vec{r}$ ,  $\vec{v}$  i  $\vec{a}$  predstavljaju položaj, brzinu i ubrzanje atoma u trenutku  $t$ . Vremenski korak ( $\Delta t$ ) koji se koristi u molekulske dinamičkim simulacijama mora biti kraći od svih gibanja koja se razmatraju. Vremenski korak korišten u našim simulacijama bio je reda veličine femtosekunde, budući da su najkraći periodi zabilježeni kod biomolekulskih sustava, oni pri istezanju veza s vodikovim atomima, oko 10 fs. Primjena ograničenja na najbrža gibanja (fiksiranje duljina kovalentnih veza s vodikovim atomima) bez utjecaja na preostale stupnjeve slobode, ostvarena pomoću dvofaznog SHAKE algoritma [32] omogućila je primjenu koraka od 2 fs u simulacijama. Uz takav korak, s današnjim kapacitetima računala, sustavi bioloških makromolekula mogu se simulirati i do reda veličine mikrosekunde. Takvi računi kao izlaz generiraju trajektorije u kojima su zapisani položaji svih atoma u danom sustavu tijekom simuliranog vremena. Budući da je broj atoma u sustavima iznimno velik (reda veličine 10 000), za pohranu tih trajektorija potrebni su čvrsti diskovi reda veličine terabajta.

U početku su se simulacije molekulske dinamike izvodile za NVE ansambl, odnosno pri konstantnome broju molova (N), volumenu (V) i energiji (E). NVE koji se još naziva i mikrokanonski ansambl odgovara adijabatskom procesu bez izmjene topline, a može se promatrati kao izmjena potencijalne i kinetičke energije unutar zatvorenog sustava. Mikrokanonski ansambl ne odgovara realnim sustavima molekula te se za njihovo simuliranje češće koriste NPT i NVT ansampli.

U NVT ansamblu [33] (koji se još naziva i kanonski) su, osim broja molova (N), konstantni volumen (V) i temperatura (T). Kanonski ansambl predstavlja distribuciju mikroskopskih stanja sustava. Za razliku od mikrokanonskog ansambla koji opisuje sustav izoliran od okoline, kanonski ansambl prikazuje sustav u interakciji s okolinom tako da s njim izmjenjuje temperaturu. Budući da je okolina puno veća od promatranog sustava njezina se temperatura pri tome ne mijenja. Tijekom simulacija molekulske dinamike (MD) temperatura u sustavu se regulira pomoću termostata, a za potrebe ovog rada je korišten Langevinov termostat, koji kontrolira temperaturu mijenjanjem brzina prema Langevinovoj jednadžbi (1.6.):

$$m_i \frac{d^2 \vec{x}_i(t)}{dt^2} = -\frac{dV}{dx} - \gamma_i \frac{d\vec{x}_i(t)}{dt} m_i + \vec{R}_i(t) \quad (1.6.)$$

Prvi član u izrazu s desne strane znaka jednakosti odgovara sili na čestice uslijed promjene potencijalne energije. Preostala dva člana simuliraju prolaz kroz otapalo, pri čemu drugi član odgovara učinku koje otapalo zbog svoje viskoznosti ima na brzine atoma, a treći, stohastički, član simulira nasumične fluktuacije uzrokovane interakcijama atoma otopljene molekule s molekulama otapala, a ovisi o  $\gamma$  i temperaturi [28]. On,  $\vec{R}$ , ima svojstvo neovisnosti o brzinama i silama u sustavu, u prethodnom vremenu simulacije, njegov je vremenski prosjek jednak nuli, a njegov srednji kvadrat iznosi  $2m_i\gamma_i k_B T_0$  [28]. Komponente stohastičke sile međusobno su nekorelirane kao što je prikazano jednadžbom (1.7.). Učestalost sudara molekula vode je približno svakih 50 ps, no tijekom simulacija se obično koristi za red veličine kraći razmak između „sudara“ što osigurava stabilnost sustava tijekom simulacija. Reskaliranje brzina prema Langevinovoj jednadžbi provodi se u pravilu svakih nekoliko tisuća koraka. U direktnom reskaliranju tijekom zagrijavanja sustava kontrola brzina provodi se na način da se brzina svakog pojedinog atoma pomnoži sa skalirajućim faktorom za željenu temperaturu (1.8.) gdje  $T$  označava trenutnu temperaturu,  $T_{md}$  željenu temperaturu, a  $v_{st}$  i  $v_{no}$  staru i novu brzinu.

$$\langle \vec{R}_{i\mu}(t) \vec{R}_{j\nu}(t') \rangle = 2m_i \gamma_i k_B T_0 \delta_{ij} \delta_{\mu\nu} \delta(t - t') \quad (1.7.)$$

$$v_{no} = \sqrt{\frac{T_{md}}{T}} v_{st} \quad (1.8.)$$

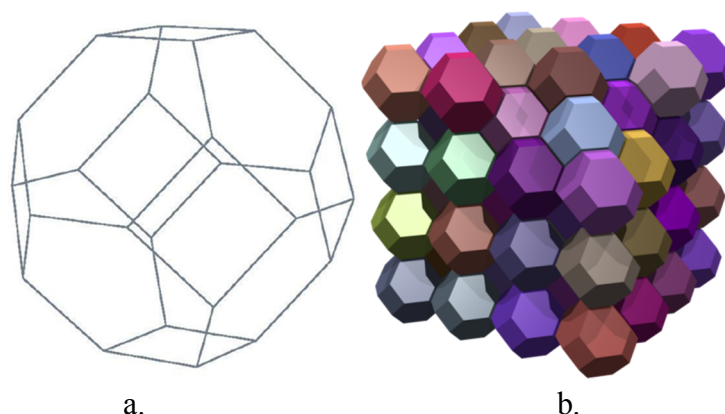
Vjerojatnost ( $p$ ) nalaženja sustava u nekom stanju energije  $E$ , određena je Boltzmannovom distribucijom (1.9.), gdje je  $Z$  particijska funkcija. Tijekom nekog konačnog vremena simulacija makromolekulski sustav prolazi kroz niz realizacija,  $N$ , koje je podesno grupirati prema sličnosti geometrija u intervale  $N_i$ . Pri tome je opravdano pretpostaviti da su energije sustava sličnih geometrija slične (obrnut zaključak ne vrijedi, tj. sustavi vrlo različitih geometrija mogu ponekad imati vrlo slične energije). Dakle, za  $N = \sum_i^M N_i$  ( $M$ = ukupni broj intervala), vjerojatnost je određene realizacije sustava dana izrazom  $p_i = N_i/N$ .

$$p_i = \frac{1}{Z} e^{-\frac{E_i}{k_B T}}; \quad Z = \sum_i e^{-\frac{E_i}{k_B T}} \quad (1.9.)$$

Gdje je  $k_B$  Boltzmannova konstanta i iznosi  $1.3806488 \times 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$ , a  $T$  termodinamička temperatura izražena u Kelvinima. Recipročna se vrijednost produkta ove dvije veličine označava grčkim slovom beta ( $\beta$ ) i naziva se inverzna termodinamička temperatura

U NPT ansamblu [34] očuvani su broj molova ( $N$ ), tlak ( $P$ ) i temperatura ( $T$ ), pa se on naziva još i izotermno-izobarni ansambl. Kako bi se postigli takvi uvjeti uz termostat je potrebno koristiti i barostat, od kojih je najpoznatiji Berendsenov barostat [35] koji je ujedno korišten u ovom radu. Ovaj se ansambl vrlo često koristi u metodama molekulske dinamike, jer se sustav molekula u laboratoriju nalazi pri konstantnom tlaku.

Računalne se simulacije mogu provoditi samo na sustavima s konačnim brojem atoma, znatno manjim od broja atoma u realnim sustavima. Kako bi simulirani sustav što više približili realnom i izbjegli neželjene efekte na granicama sustava koristi se periodičnost. Periodični rubni uvjeti (*engl.* Periodic Boundary Conditions, PBC [36]) omogućuju da se simulacije izvode s relativno malim brojem čestica na način da na čestice djeluju sile kao da su u neograničenom fluidu. To se postiže na način da se osnovni sustav (oblika npr. krnjeg oktaedra, slika 1.8.) replicira u svim smjerovima, tako da se rubovi savršeno poklapaju. Replicirani se sustavi nazivaju *slike*, i ima ih beskonačno puno. Krnji oktaedar ima 74 susjeda identičnog oblika u koji čestice iz originalne kutije mogu difundirati. Sve se čestice uvijek mogu preslikati u originalnu kutiju ili u bilo koju od imaginarnih slika, ovisno o relacijama koje se žele promatrati.



**Slika 1.8.** a) prikaz krnjeg oktaedra (preuzeto sa sf.anu.edu.au [37]); b) krnji oktaedar koji je repliciran u svim smjerovima (preuzeto sa common.wikimedia.org [38])

Za računanje elektrostatskih interakcija u periodičnim sustavima se koriste metode temeljene na Ewaldovoj sumaciji, a jedna od najraširenijih je PME (*engl.* Particle Mesh Ewald) metoda [39] koju smo i mi koristili. Ovaj algoritam elektrostatskim interakcijama u originalnoj kutiji dodaje interakcije osnovne sa svim ostalim, imaginarnim, kutijama definiranim pomoću PBC-a pri čemu se one računaju u recipročnom prostoru.

Metode molekulske dinamike mogu dati detaljne informacije o strukturnim i dinamičkim promjenama svojstva proteina te o njihovim promjenama uslijed promijenjenih početnih uvjeta (temperatura, pH, točkaste mutacije).

Osim regularnih MD simulacija postoje još neke korisne varijante istih. Tijekom usmjerenih MD simulacija (*engl.* Steered Molecular Dynamics (SMD) [40]) na izabrane se atome primjenjuje sila koja usmjerava njihovo kretanje u smjeru određenog stupnja slobode, kao što je prikazano jednačom 1.10. Često se koriste za interakcije kojima je cilj mehaničko odmatanje, ili istezanje, no može se koristiti i kao alat za uklapanje liganda u aktivno mjesto proteina i pronalazak njegovog optimalnog položaja. Za ove je simulacije potrebno definirati skupine atoma (njihove centre masa) koje želimo privlačiti, početnu i željenu udaljenost centara masa i silu kojom će se oni međusobno privlačiti.

$$\vec{F} = k_{\text{potezanje}} \left[ \vec{x}_{\text{hvatište}}(t) - \vec{x}_{\text{cilj}}(t) \right] \quad (1.10.)$$

RAMD [41] (*engl.* Random Acceleration Molecular Dynamics) je postupak koji se koristi u svrhu pronalaska izlaznog puta liganda u slučaju kada su vezani duboko unutar proteina. Simulacije izlaska supstrata iz aktivnog mjesta standardnim MD simulacijama, u takvim slučajevima su praktički neizvedive, budući da je vrijeme izlaska izvan njihovog



dosega. Posebno se taj problem javlja kada vezno mjesto nije izloženo otapalu (kao što je to slučaj kod Dke1). RAMD metoda zaobilazi taj problem primjenjujući slabu silu na ligand u nasumično izabranom smjeru kako bi se povećala vjerojatnost spontanog izlaska (jednadžba 1.11.). Ako se ligand ne pomakne nakon definiranog broja koraka smjer se ponovno nasumično mijenja. Simulacije se prekidaju kada ligand napusti protein, odnosno kada udaljenost između centara mase postane veća od 30 Å, ili kad se dosegne maksimalni zadani broj koraka.

$$\vec{F} = k \times \vec{r}_0 \quad (1.11.)$$

Gdje je  $k$  konstanta sile, a  $\vec{r}_0$  jedinični vektor u nasumičnom smjeru.

Veliki dio bioloških sustava čine molekule vode, stoga je potrebno pažljivo definirati tip molekula vode koje će se koristiti u simulacijama. Najučestalije se koriste SPC, SPC/E, TIP3P i TIP4P modeli no pored njih postoji još niz različitih reprezentacija za molekule vode. SPC [42] i TIP3P [43] koriste ukupno tri mjesta za elektrostatske interakcije. Ova se dva modela razlikuju u geometriji molekula vode, naboju na vodikovim atomima, i Lennard-Jonesovim parametrima (tablica 1.1.). Npr. SPC model pretpostavlja da je kut H-O-H idealni tetraedarski (109,47°) dok TIP3P model uzima standardni kut (104,5°). Parcijalni pozitivni naboji na vodikovim atomima su uravnoteženi s jednakim iznosom pozitivnog naboja na kisikovom atomu. Van der Waalsove interakcije između dviju molekula računaju se koristeći Lennard-Jonesovu funkciju s jednom interakcijskom točkom po molekuli centriranom na kisikovom atomu. SPC/E model modificirani je SPC model s nepromjenjivim nabojima čije korištenje rezultira dodavanjem 1,25 kcal/mol ukupnoj potencijalnoj energiji molekule. Korištenje tog modela omogućuje bolje modeliranje gustoće i difuzijske konstante. TIP4P model ima 4 interakcijska mjesta, u tom se modelu negativni naboj ne nalazi na atomu kisika, već je po visini jednakokračnog trokuta, kojega opisuju atomi molekule vode, pomaknut prema bazi trokuta. Ovaj se model naročito često koristi kod simulacije vode u čvrstom stanju. U disertaciji je korišten model vode TIP3P.

Za potrebe MD i MM računa u ovoj disertaciji korišteni su programski paketi AMBER8, AMBER11 i AMBER12 [45] (*engl.* Assisted Model Building with Energy Refinement) i njima pripadajuća polja sila. Za račune MM i za MD simulacije korišteni su moduli sander (*engl.* Simulated Annealing with NMR-Derived Energy Restraints) i pmemd (*engl.* Particle Mesh Ewald Molecular Dynamics), koji se osim na centralnim procesorima mogu izvoditi na Nvidia grafičkim procesorima [46, 47]. Programski paketi AMBER11 i

AMBER12 podržavaju usmjerene SMD simulacije, a simulacije s nasumičnom silom, RAMD, izvode se korištenjem programskog paketa AMBER08.

**Tablica 1.1.** Usporedba modela molekula vode (preuzeto iz *Jorgensen i sur.* [44])

|   | SPC    | TIP3P  | SPC/E   | TIP4P          |
|---|--------|--------|---------|----------------|
| Udaljenost O-H [Å]                        | 1,0    | 0,9572 | 1,0     | 0,9572         |
| Kut H-O-H [°]                             | 109,47 | 104,52 | 109,47  | 104,52         |
| Koeficijent A [kcal Å <sup>12</sup> /mol] | 629,4  | 582,0  | 629,4   | 600,0          |
| Koeficijent B [kcal Å <sup>6</sup> /mol]  | 625,5  | 595,0  | 625,5   | 610,0          |
| Naboj na O [e <sup>-</sup> ]              | -0,82  | -0,834 | -0,8472 | 0 <sup>a</sup> |
| Naboj na H [e <sup>+</sup> ]              | 0,41   | 0,417  | 0,4238  | 0,52           |

### 1.2.2. Kvantno mehaničke metode

Za razliku od empirijskih metoda, *Ab initio* QM pristup proučava raspodjelu elektrona na sustavu. U tom se, subatomsom pristupu mogu detaljno proučavati stanja atoma i veze među njima te pratiti kemijske reakcije. Kvantno mehaničke se metode koriste za izračun širokog spektra svojstava. Osim termodinamičkih i strukturnih vrijednosti ovim se metodama mogu izračunati i svojstva koja se temelje na elektronskoj distribuciji. Kvantno mehaničke metode ne koriste nikakve empirijske ili semiempirijske parametre u svojim jednadžbama nego su izvedene na teorijskim osnovama, bez utjecaja eksperimentalnih podataka te se nazivaju *ab initio* metode.

Polazna točka za kvantno mehaničke račune je Schrödingerova jednadžba (1.12.), koja u svom vremenski ovisnom obliku glasi:

$$\left\{ -\frac{\hbar^2}{2m} \left( \frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2} \right) + V \right\} \Psi(\vec{r}, t) = i\hbar \frac{\partial \Psi(\vec{r}, t)}{\partial t} \quad (1.12.)$$

gdje je  $\hbar$  reducirana Planckova konstanta,  $m$  masa čestice koja se giba kroz prostor, a  $\vec{r}$  njezin položaj ( $\vec{r} = x\vec{i} + y\vec{j} + z\vec{k}$ ) u vremenu  $t$  pod utjecajem vanjskog polja  $V$ .  $\Psi$  je valna funkcija koja opisuje gibanje čestice i na temelju koje se mogu odrediti svojstva čestice. Ako je vanjski potencijal  $V$  neovisan o vremenu, onda se Schrödingerova jednadžba može napisati u jednostavnijem i poznatijem, vremenski neovisnom obliku (1.13.):

<sup>a</sup> naboj je u odnosu na atom kisika pomaknut za 0,15 Å i iznosi -1,04e.

$$\left\{ -\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2 + V \right\} \Psi(\vec{r}) = E \Psi(\vec{r}); \quad (1.13.)$$

gdje je  $E$  energija čestice. Lijevu stranu jednadžbe možemo zapisati kao  $H\Psi$ , gdje je  $H$  operator hamiltonijan. Tada se jednadžba može reducirati na  $H\Psi=E\Psi$ .

Pri proučavanju svojstava molekula i kemijskih reakcija najčešće se koristi Born–Oppenheimerova aproksimacija koja omogućuje odjeljivanje gibanja elektrona od gibanja jezgri. Ukupna valna funkcija (molekule, odnosno promatranog sustava) može se napisati kao produkt elektronske i nuklearne valne funkcije, pri čemu se najčešće razmatraju samo elektronske valne funkcije uz određen položaj jezgri. U tom slučaju Hamiltonijan je dan izrazom (1.14.):

$$H = -\frac{\hbar}{2m_e} \sum_i \nabla_i^2 - \sum_i \sum_{\alpha} \frac{Z_{\alpha} e^2}{4\pi\epsilon_0 |\vec{r}_i - \vec{r}_{\alpha}|} + \frac{1}{2} \sum_i \sum_{j \neq i} \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0 |\vec{r}_i - \vec{r}_j|} \quad (1.14.)$$

Gdje su  $\vec{r}_i$  i  $\vec{r}_j$  položaji elektrona koji se razmatraju, a  $Z_{\alpha}$  atomski broj jezgre,  $\hbar$  reducirana Planckova konstanta ( $1,0546 \cdot 10^{-34}$  Js), a  $m_e$  masa elektrona.

Jedna je od najstarijih i najpoznatijih *ab initio* metoda Hatree-Fock (HF) [48], koja je nastala razvojem teorije molekulskih orbitala. HF je aproksimacijska metoda za utvrđivanje valne funkcije sustava s više elektrona, pri čemu se elektroni koji međusobno ne interagiraju promatraju u srednjem polju ostalih elektrona i jezgri. Za razliku od metode molekulskih orbitala, ona prema osnovnim kvantno mehaničkim načelima pretpostavlja valnu funkciju sustava kao asimetrični produkt elektronskih valnih funkcija. Da bi se odlučilo koja je valna funkcija bolja, koristi se varijacijski teorem, prema kojem će energija izračunata aproksimativnom metodom uvijek biti viša od stvarne energije, što znači da će bolja valna funkcija uvijek imati nižu energiju. HF jednadžbe u izrazu za energiju postavljaju uvjet da je u minimumu prva derivacija energije jednaka nula. Budući da se u ovoj metodi Schrödingerova vremenski neovisna jednadžba rješava za sustave sa više čestica, do rješenja se dolazi numeričkim metodama. Numeričke metode pri rješavanju koriste iteracije pa je potrebno odrediti zadovoljava li valna funkcija kriterij samodosljednosti (*engl.* Self-Consistent Field, SCF) u odnosu na početnu pretpostavljenu funkciju. Da bi HF metoda bila učinkovita mora uzeti u obzir nekoliko pretpostavki kao što su Born-Oppenheimerova

aproksimacija, zanemarivanje relativističkih efekata, rad sa konačnim brojem baznih funkcija, i druge.

Druga metoda, koja ima vrlo čestu primjenu u kvantno mehaničkim računima, a koja je pored HF metode također korištena u računima prikazanim u ovom radu, je DFT [49] (*engl.* Density Functional Theory) metoda. Prednost je ove metode što je računalno manje zahtjevana od HF metode, a to znači kraće računalno vrijeme i uštedu energije te se posljednjih dvadesetak godina ekstenzivno primjenjuje. Za razliku od HF, DFT metoda polazi od pretpostavke da je energija sustava u potpunosti određena matricom elektronske gustoće čime se dimenzionalnost problema značajno reducira [50].

U računima kvantne mehanike potrebno je odabrati bazni skup, sastavljen od skupa funkcija koje međusobnim linearnim kombinacijama tvore molekulske orbitale. Uobičajeno je koristiti bazni skup koji se sastoji od konačnog broja orbitala centriranih na jezgri svakog atoma u molekuli. Molekulske se orbitale dobivaju linearnom kombinacijom atomskih orbitala. U početku su se uobičajeno koristile Slaterove orbitale (čiji je radijalni dio prikazan u jednadžbi 1.15.; gdje  $\zeta$  predstavlja orbitalni eksponent,  $r$  radijus atoma,  $n$  glavni kvantni broj, a  $N$  normalizacijsku konstantu) u kojima su dopuštene višeelektronske valne funkcije zapisane u determinantama. Poteškoća kod tih orbitala pojavila se pri izračunavanju integrala, koje je vrlo često nemoguće izračunati. Iz tog se razloga one vrlo često zamjenjuju Gausovim funkcijama (čiji je radijalni dio prikazan u jednadžbi 1.16.; gdje je  $\alpha$  konstanta i iznosi 0,4166).

$$STO = Nr^{n-1}e^{-\zeta r} \quad (1.15.)$$

$$GTO = \left(\frac{2\alpha}{\pi}\right)^{\frac{3}{4}} e^{-\alpha r^2} \quad (1.16.)$$

Minimalni bazni skup je reprezentacija koja sadrži minimalni broj funkcija potrebnih za opis svih (potpuno ili djelomično) popunjene orbitale u atomu, odnosno za opis elektronske strukture molekula. Jedan je od problema takvih baznih skupova što su atomi s kraja periode opisani istim brojem funkcija kao i atomi sa početka, što nije dobro za atome poput fluora i kisika. Problem se rješava tako da se pri opisu svake orbitale koristi više od jedne funkcije. Ranijim je istraživanjima potvrđeno da su potrebne najmanje tri Gaussove funkcije za dobar opis svake atomske orbitale, a korištenje više od tri Gaussove funkcije ne daje značajnu razliku u rezultatima [51]. Bazni skup koji udvostručuje broj funkcija u minimalnom baznom skupu naziva se dvostruki zeta bazni skup, koji utrostručuje trostruki, itd. Ti se bazni skupovi

koriste za opis valentnih orbitala. Osnovnom baznom skupu mogu se dodati difuzne ili polarizacijske funkcije što označavamo sa + ili ++ za difuzne funkcije te \* i \*\* (odnosno (d,p)) za polarizacijske funkcije.

Kvantno mehanički se računi mogu izvoditi u plinskoj fazi (bez prisutnosti otapala), ili uz prisutnost otapala. Najčešća metoda za simuliranje prisutnosti otapala je PCM (*engl.* Polarizable Continuum Model [52]), koji račune čini lakše izvodivima, jer se ne mora uzimati u obzir svaka molekula otapala, nego se otapalo promatra kao polarizirani kontinuum. Dvije najučestalije vrste PCM-a su D-PCM (*engl.* Dielectric PCM) koji kontinuum tretira kao polarizirani dielektrik i CPCM [53] (*engl.* Conductor-like PCM) koji kontinuum tretira kao sredstvo konstantne permitivnosti  $\epsilon$ , kakvo je npr. protein. Potonji model koristili smo u našim kvantno mehaničkim računima.

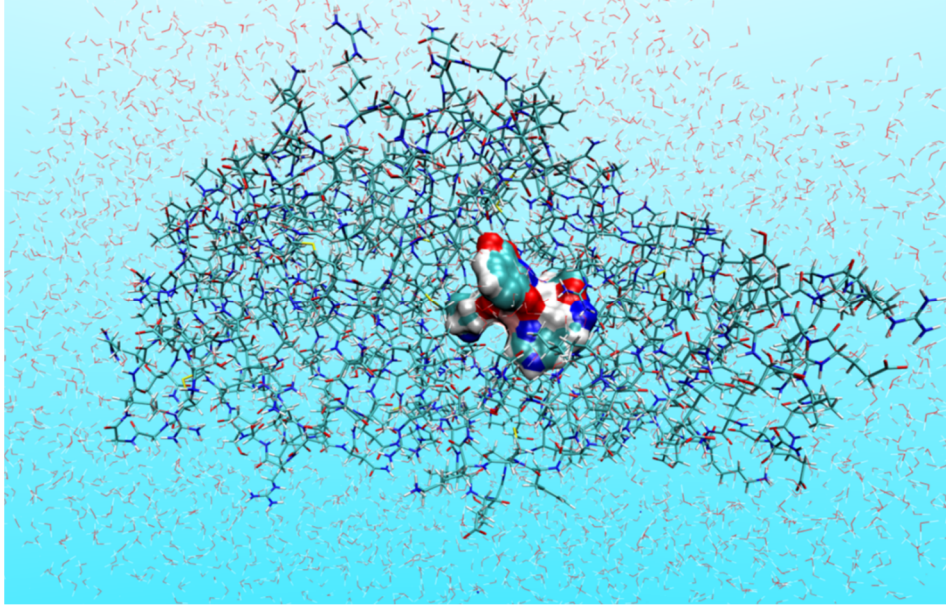
Kvantno mehanički računi izvedeni su u programskim paketima GAMESS [54] i GAUSSIAN [55].

### 1.2.3. Kombinirani kvantno mehanički-molekulska mehanički model

Zbog zahtjevnosti QM računa, za proučavanje reakcija u enzimima, primjenjuju se kombinirane kvantno mehaničke-molekulska mehaničke (QM/MM) metode, pri čemu se jedan manji dio enzima, najčešće aktivno mjesto, razmatra kvantno mehaničkim, a ostatak proteina empirijskim pristupom (slika 1.9).

Jedna od najučestalije primjenjivanih QM/MM metoda, je ONIOM [56] (*engl.* Our own N-layered Integrated molecular Orbital and Molecular mechanics) metoda. U ovoj disertaciji korištena je dvoslojna ONIOM metoda ugrađena u programski paket Gaussian, pri čemu je veći, vanjski sloj sustava opisan AMBER ff99 [57] poljem sila. Ukupna se energija ONIOM sustava računa prema jednadžbi 1.17. Ukupnoj energiji realnog sustava izračunatoj empirijskom, MM, metodom, doda se energija modelnog (QM dijela) sustava, a oduzme energija modelnog sustava izračunata empirijskom metodom. Ovakav način izračuna svrstava ONIOM u subtraktivne QM/MM metode.

$$E^{ONIOM} = E^{r,MM} + E^{m,QM} - E^{m,MM} \quad (1.17.)$$



**Slika 1.9.** Prikaz sustava za čije se proučavanje koristi QM/MM metoda, pri čemu je dio koji se tretira kvantno mehanički omeđen, prema pripadajućim atomima obojenom, ovojnicom.

U ONIOM metodi postoje dva načina računa elektrostatskih interakcija između QM i MM slojeva, od kojih je prvi klasično, odnosno mehaničko uklapanje (*engl.* mechanical embedding, ME). U tom pristupu se QM dijelu nameću isključivo steričke interakcije od strane proteina koji katalizira reakciju. Drugi pristup je elektroničko uklapanje (*engl.* Electronical Embedding, EE), kojem se parcijalni naboji iz MM područja ugrađuju u kvantno mehanički hamiltonijan. Ova metoda daje bolji opis elektrostatskih interakcija između QM i MM dijelova, jer omogućuje polarizaciju QM dijela (valne funkcije) ovisno o raspodjeli naboja u MM dijelu. U EE ONIOM računima jednačba 1.17. prelazi u 1.18. [58]:

$$\begin{aligned}
 E^{ONIOM(EE)} &= E^{r,MM} + E_v^{m,QM} - E_V^{m,MM} \\
 E_v^{m,QM} &= E^{m,QM} - \sum_i \sum_N \frac{s_N q_N}{r_{iN}} + \sum_J \sum_N \frac{Z_J s_N q_N}{r_{JN}} \quad (1.18.) \\
 E_V^{m,MM} &= E^{m,MM} + \sum_J \sum_N \frac{q_J s_N q_N}{r_{JN}}
 \end{aligned}$$

gdje se  $N$  odnosi na atome iz MM područja,  $J$  na atome iz QM područja a  $i$  na elektrone. Skalirajući faktor  $s_N$  se koristi da bi se izbjegla prekomjerna polarizacija valne funkcije zbog velikih naboja u blizini QM područja. Obično je  $s_N$  nula za naboje koji su manje tri veze udaljeni od QM dijela.

#### 1.2.4. Semiempirijski model

Semiempirijske metode koriste niz empirijskih parametara čime se računi pojednostavljaju i ubrzavaju. Najpoznatije semiempirijske metode su MNDO, AM1, PM3 te u skorije vrijeme razvijena PM6 metoda [59] koja je trenutačno najpogodnija za računanje na biokemijskim sustavima koji sadrže prijelazne metale. Za razliku od ostalih spomenutih semiempirijskih metoda PM6 u obzir uzima d-orbitale te je pogodna za proučavanje željeza. Iako utemeljene na kvantno mehaničkom formalizmu, semiempirijske metode uključuju i neke empirijske parametre koji su u ovim metodama podešeni tako da računalni rezultati odgovaraju eksperimentalnima.

Budući da semiempirijski računi traju znatno kraće od kvantno mehaničkih, pogodni su za preliminarne proračune, što pridonosi znatnoj uštedi računalnog vremena, a time i energije. Na tako dobivene preliminarne modele kod kojih je postignuta zadovoljavajuća konvergencija primjenjuju se dalje kvantno mehanički računi. Za semiempirijske račune korišteni su programski paketi MOPAC [60] i TRITON [61, 62] te modul DRIVER [63] koji ih koordinira.

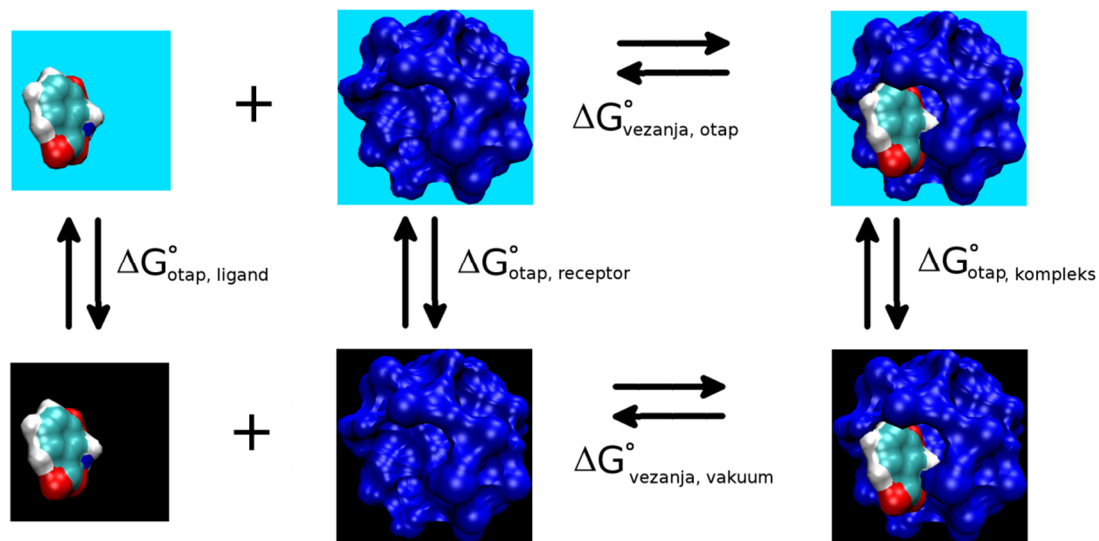
#### 1.2.5. Ostale računalne metode

##### 1.2.5.1. MM-PBSA

Za račune slobodne energije vezanja korišten je MM-PBSA [64] (*engl.* Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Solvent Accessible Area) modul koji je sastavni dio programskog paketa AMBER. Metoda se temelji na računu razlike slobodne energije između vezanog i nevezanog stanja dviju otopljenih molekula, ili alternativno kako bi se usporedile slobodne energije različitih konformacija iste molekule. Računi se izvode tako da se dijelovi sustava tretiraju prema termodinamičkom ciklusu (slika 1.10.)

Iz dijagrama je vidljivo da se Gibbsov potencijal, odnosno, budući da se promatra sustav pri konstantnom tlaku, slobodna energija vezanja, ( $\Delta G_{vezanja,otap}^{\circ}$ ) može izračunati preko relacije (1.19.):

$$\Delta G_{vezanja,otap}^{\circ} = \Delta G_{vezanja,vakuum}^{\circ} + \Delta G_{otap,kom}^{\circ} - \left( \Delta G_{otap,lig}^{\circ} + \Delta G_{otap,rec}^{\circ} \right) \quad (1.19.)$$



**Slika 1.10.** Termodinamički ciklus za računanje vezanja otopljenog liganda za otopljeni protein, plava pozadina označava prisutno otapalo, a crna pozadina vakuum (preuzeto sa [www.ambermd.org](http://www.ambermd.org) [65] i preuređeno)

U MM-PBSA pristupu različiti doprinosi energiji vezanja izračunati su na različiti način. Slobodna energija otapanja izračunata je kao rješenje linearizirane Poisson-Boltzmannove jednačbe uz dodavanje empirijskog člana za nepolarne doprinose  $\Delta G_{hidrof}$  (1.20.).

$$\Delta G_{otop}^{\circ} = \Delta G_{est, \epsilon=80}^{\circ} - \Delta G_{est, \epsilon=1}^{\circ} + \Delta G_{hidrof}^{\circ} \quad (1.20.)$$

$\Delta G_{vakuum}^{\circ}$  dobivena je računanjem prosječne interakcijske energije između receptora i liganda uzimajući u obzir promjenu entropije zbog vezanja (1.21.).

$$\Delta G_{vakuum}^{\circ} = \Delta E_{MM} - T\Delta S_{NM}^{\circ} \quad (1.21.)$$

Entropijski se doprinos može dobiti analizom normalnih modova na tri različita sustava, ali se u praksi može zanemariti ako se traži samo relativna razlika energija sličnih stanja.

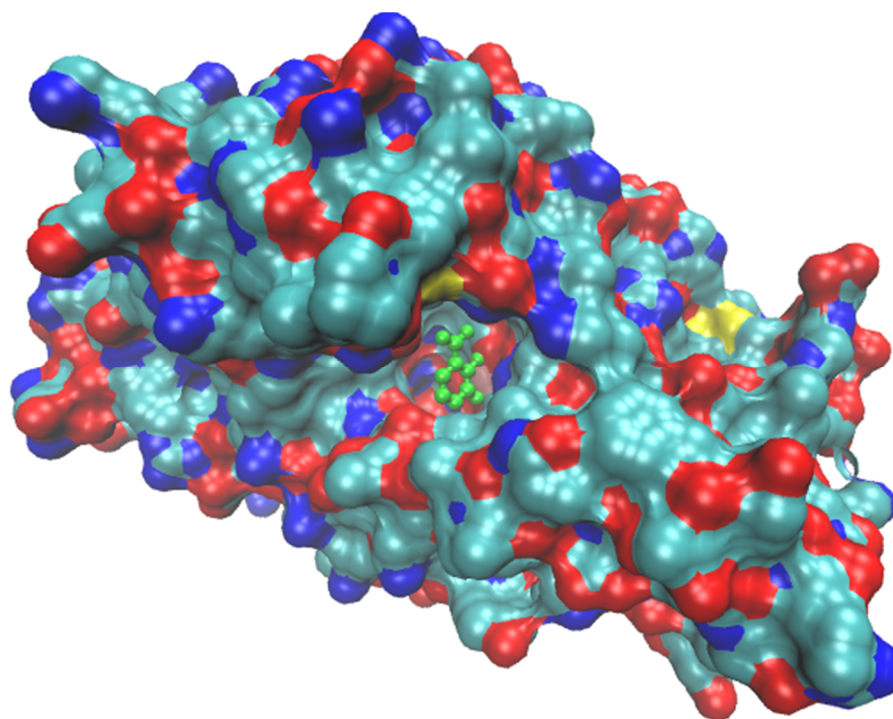
#### 1.2.5.2. Metoda uklapanja

Uklapanje (prianjanje, *engl.* docking) je metoda koja predviđa najpovoljniji položaj (orijentaciju) jedne molekule prema drugoj kada se jedna za drugu vežu u stabilan kompleks



(slika 1.11.). Ova metoda ima široku primjenu u predviđanju vezanja proteinskih inhibitora i supstrata. Metode računanja energije vezanja koriste pretpostavku da se slobodna energija vezanja može odrediti kao aditivna funkcija različitih komponenti tj. doprinosa jačini vezanja [66]. Jednadžba [67] (1.22.) uključuje neke od navedenih doprinosa slobodnoj energiji: uslijed uklanjanja liganda i pojedinih dijelova proteina iz otapala ( $\Delta G_{otap}$ ), konformacijske promjene u proteinu i ligandu ( $\Delta G_{konf}$ ), specifične ligand-protein interakcije ( $\Delta G_{int}$ ), gubitak energije zbog smanjenja rotacijske entropije liganda i proteina ( $\Delta G_{rot}$ ) te gubitak translacijske i rotacijske entropije liganda ( $\Delta G_{t/r}$ ) i promjenu vibracijske entropije ( $\Delta G_{vib}$ ). Radi povećanja brzine, pojedine metode zanemaruju neke od ovih doprinosa.

$$\Delta G_{vez} = \Delta G_{otap} + \Delta G_{konf} + \Delta G_{int} + \Delta G_{rot} + \Delta G_{t/r} + \Delta G_{vib} \quad (1.22.)$$



**Slika 1.11.** Ligand (zeleno, CPK reprezentacija) uklopljen (dokiran) u enzim 3HAO prikazan preko otapalu dostupnih površina.

Težinske funkcije (*engl.* scoring functions) odbacuju većinu članova iz jednadžbe 1.22., no unatoč tome daju vrlo pouzdane rezultate u značajno kraćem računalnom vremenu, stoga je njihova primjena danas vrlo raširena. Većina težinskih funkcija pokušava izračunati energiju vezanja za sve orijentacije, no budući da je račun energije pojedinih komponenti složen i dugotrajan, uvode se brze aproksimativne metode. Veliki broj algoritama daje cijeli niz mogućih struktura te koristi određene načine ocjenjivanja da bi se utvrdilo koja je

orijentacija najpovoljnija. Neke je od mogućih orijentacija moguće odmah odbaciti, budući da daju vrlo visoke energije vezanja sa proteinom. Ostale se moraju procijeniti koristeći neku od težinskih funkcija.

Radi pronalaska što povoljnijeg načina vezanja u disertaciji je korišten program AutoDock [68]. Osim AutoDocka, za utvrđivanje najpovoljnije orijentacije liganda u aktivnom mjestu korištene su usmjerene MD simulacije, budući da one uzimaju u obzir steričke i Coulombske potencijale te omogućuju međusobno prilagođavanje liganda i veznog uvjeta

#### 1.2.5.3 Ptraj

Još jedan u nizu modula, programskog paketa AMBER, koji služi za analizu trajektorija je *ptraj*. Pomoću njega je moguće pratiti međusobne udaljenosti pojedinih atoma (odnosno centara masa definiranih skupina atoma), kutove među atomima, plošne kutove, srednji kvadratni pomak svih atoma, fluktuacije pojedinih aminokiselina, provoditi analize zastupljenosti vodikovih veza, popunjenost koordinacijskih sfera molekulama vode...

Ptraj radi s periodičnim sustavima, na način da ako je pojedini atom difundirao u susjednu sliku, on ga implicitno vraća u originalnu kutiju te u ga uključuje u analize.

#### 1.2.5.4. Caver

Caver [69] je program za analizu i vizualizaciju tunela i kanala u proteinskim strukturama. Tuneli u proteinima su s jednog kraja otvoreni otapalu, a drugi kraj završava u aktivnom, odnosno veznom mjestu, dok kanali prolaze kroz cijeli protein i imaju oba otvora izložena otapalu. Caver se koristi kao dodatak PyMol-u [70], programu za vizualizaciju proteina.

#### 1.2.5.5. GRID

Računalni postupak za utvrđivanje energijski povoljnih položaja malih molekula ili funkcionalnih skupina, tzv. „proba“ u i oko molekula poznate 3D strukture rađen je pomoću programa GRID [71]. Ovaj postupak uzima u obzir Lennard-Jonesove i Coulombske interakcije. Postupak se provodi tako da se čitava (makro) molekula ili neko njezino područje, kao što su npr. vezna mjesto za ligande opiše pravilnom, trodimenzionalnom, najčešće kubičnom, rešetkom. Što su udaljenosti čvorova rešetke manji raspodjela povoljnih i

nepovoljnih položaja za neku probu u promatranom volumenu bit će preciznija. Obično se koriste rešetke s udaljenosti čvorova od 0,5 – 1,0 Å. Na svakom čvoru rešetke računa se interakcija između molekule i „probe“, točnije, potencijalna energija „probe“ u prisutnosti molekule od interesa. Funkcija energije uključuje Lennard-Jonesov potencijal te Coulombski i potencijal vodikove veze.

#### 1.2.5.6. VMD [72]

Računalni program za vizualizaciju, koji može prikazati većinu formata u kojima se zapisuju molekulske koordinate. Također može učitati i vizualizirati cijele trajektorije koje su dobivene kao izlazi iz AMBER-a te ih je na taj način moguće analizirati. Osim toga, program pruža niz načina za prikazivanje molekula te je većina slika u radu napravljena upravo pomoću njega.

### 1.3. Predmet i cilj disertacije

Predmet ove doktorske disertacije je molekulsko modeliranje gore navedenih enzima i njihovih kompleksa kako bi se pojasnili eksperimentalni rezultati, odnosno dobili odgovori na pitanja izvan dosega (ili na rubu dostižnosti) eksperimentalnih metoda. Tako se npr. prijelazna stanja u reakcijama ne mogu eksperimentalno proučavati budući da su nestabilna i vrijeme koje sustav u njima provede najčešće je prekratko za eksperimentalne analize [73], a upravo su ona ključna za razumijevanje i predviđanje tijeka reakcija.

Cilj ove disertacije je teorijskim pristupom provjeriti svojstva enzima sa željeznim ionom u aktivnom mjestu. Za ostvarenje toga cilja korišten je cijeli niz računalnih metoda, različitog stupnja složenosti i različite točnosti, radi što optimalnijeg korištenja računalnih resursa.

## 2. METODE

### 2.1. Acetilaceton dioksigenaza iz *Acinetobacter Josoi* (Dke1)

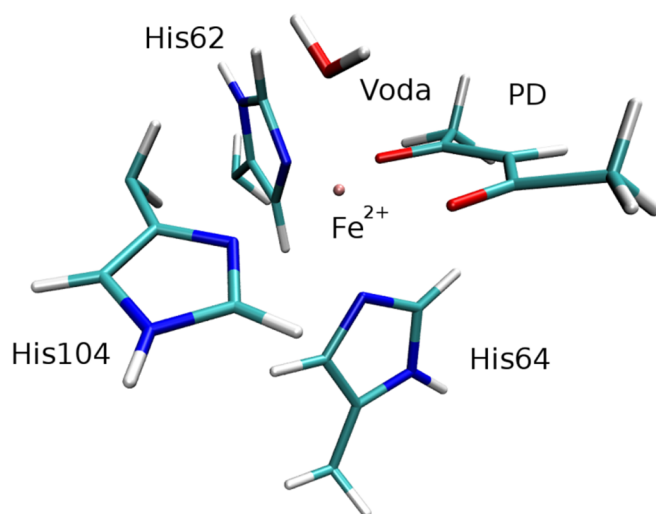
Za potrebe računalnih studija Dke1 enzima iz PDB baze preuzeta je struktura pod kodom 3BAL, koja u veznom mjestu sadrži cinkov ion u sve četiri monomerne podjedinice i ne sadrži vezani ligand. Kako cinkov ion ne aktivira enzim, on je za potrebe modeliranja zamijenjen s ionom željeza,  $\text{Fe}^{2+}$ . Iz kristalne strukture uklonjene su molekule vode koje su ostale zarobljene u proteinu prilikom postupka kristalizacije, jer je jedna od važnijih analiza bila praćenje ulaska molekula vode u protein i identifikacija „tunela“ kojima one s površine proteina putuju do aktivnog mjesta. Budući da struktura pohranjena u PDB bazi ne sadrži atome vodika trebalo ih je dodati (u tu svrhu korišten je modula *tLeap*), pri čemu je posebno trebalo paziti na pravilnu protonaciju histidinskih liganda. *TLeap* u pravilu protonira  $\text{N}_\epsilon$  što nije uvijek u skladu s okruženju u kojem se histidin nalazi. Tako je od tri aminokiselinska ostatka koji koordiniraju ion željeza u Dke1, dva, His62 i His64 trebalo protonirati na  $\delta$ -položaju, dok je treći, His104,  $\epsilon$ -protoniran. Da bi izgradili kompleks enzima sa supstratom, Dke1-PD, u kojem je supstrat ne kovalentno vezan u aktivno mjesto enzima, koristili smo postupak uklapanja (dokiranja). Taj je postupak proveden pomoću programa Autodock [68].

Za vjerodostojno simuliranje ponašanja enzima i njegovih kompleksa u otapalu empirijskom metodom molekulske dinamike (MD) potrebno je imati odgovarajuće parametre. Za navedene sustave korištena su polja sila ff03 [74], ff10 i ff12SB [75] za proteine te s njima kompatibilno polje sila, GAFF [76] (General AMBER Force Field), koje sadrži parametre za većinu malih organskih molekula.

#### 2.1.1. Razvoj parametara za željezo

Budući da parametri za dikation željeza i PD nisu sastavni dio navedenih polja sila, trebalo ih je odrediti pomoću QM računa. Struktura preliminarnih modela (slika 2.1.) optimizirana je najprije semiempirijskim računima korištenjem programskog paketa MOPAC, nakon čega je uslijedila optimizacija sustava kvantno mehaničkom metodom i određivanje parcijalne raspodjele naboja. U tu svrhu koristili smo HF metodu i bazni skup 6-311G(p,d) [77, 78], ugrađene u programski paket Gaussian. Radi utvrđivanja distribucije parcijalnih naboja koji će biti u skladu s AMBER poljem sila i zahtjevima empirijskog pristupa, korišteno je nekoliko različitih metoda: a) određivanje naboja na temelju elektrostatskog potencijala

sustava [79], b) izračunavanje naboja iz dipolnih svojstava atoma (APT – *engl* Atomic Polar Tensor [80]), c) Mullikanovom metodom, tj. korištenjem linearne kombinacije atomskih orbitala [81].



**Slika 2.1.** Modelni sustav korišten za kvantno mehaničke račune koji odgovara stvarnom okruženju  $\text{Fe}^{2+}$  u enzimu (Dke1).

Za određivanje ravnotežnih vrijednosti duljine veza, iznosa kutova, plošnih kutova te njima pripadajućih konstanti sila pripremljeno je nekoliko modelnih sustava, a njihova geometrija je optimizirana korištenjem neograničenih (UHF [82, 83], *engl*. Unrestricted Hatree-Fock) HF računa i trostruke zeta valentne (TZV, *engl* Triple Zeta Valence) funkcije (baznog skupa) za ugljik, dušik i kisik, na način kako su ugrađeni u programski paket GAMESS. Za vodik, ugljik, dušik i kisik korišten je jednak bazni skup 6-311G\*, dok je željezo karakterizirano s kontrakcijom {5111111111/41111111/411}.

### 2.1.2. MD simulacije; prirodni protein u kompleksu s ligandom

Nakon parametrizacije enzima odnosno njegovih kompleksa (svakom je atomu u sustavu pridružen skup parametara koji su potrebni za izračunavanje međusobnih interakcija) provedena je njegova neutralizacija i otapanje. Dke1, kao i njegovi kompleksi s PD, postavljeni su u krnji oktaedar ispunjen TIP3P molekulama vode [43], na način da sloj molekula vode seže minimalno do udaljenosti od 8 Å od površine proteina. Negativni naboj sustava neutraliziran je dodavanjem iona natrija ( $\text{Na}^+$ ) koji su smješteni u blizinu nabijenih aminokiselinskih ostataka na površini proteina. Za atome koji nisu definirani u Amber polju sila, potrebni parametri (naboji, radijusi, duljine veza, iznosi kutova i plošnih kutova te njima

pripadajuće barijere, i nevezni parametri) dodani su korištenjem modula *antechamber*, a zatim je čitav sustav parametriziran korištenjem modula *tleap* koji ujedno dodaje i ione potrebne za neutralizaciju sustava i molekule vode. Sustavi koje smo proučavali, a sastojali su se od enzima, molekula vode, supstrata i iona imali su približno između 30 000 i 50 000 atoma. Simulacije su izvođene korištenjem periodičnih rubnih uvjeta (PBC), a elektrostatske interakcije su računate koristeći PME metodu [39].

Prije MD simulacija geometrija proteina je optimizirana metodama molekulske mehanike u 4 ciklusa s različitim ograničenjima na gibanje proteina. U prvom ciklusu (10 000 koraka) molekule vode i supstrati su bili slobodni, tj. na njihove atome nisu postavljena nikakva ograničenja, dok su gibanja proteina i željeza ograničena uvođenjem harmonijskog potencijala s vrlo velikom konstantom sile od 500 kcal/mol/Å<sup>2</sup> (dakle ukoliko bi se atom pomakao za 1 Å energija sustava bi se povisila za 500 kcal/mol). U drugom i trećem ciklusu, koji su se također sastojali od 10 000 koraka svaki, konstanta sile koja je ograničavala gibanje željeza reducirana je najprije na 50 kcal/mol/Å<sup>2</sup>, a zatim na 32 kcal/mol/Å<sup>2</sup>, dok je konstanta sile na okosnicu proteina reducirana najprije na 50 kcal/mol/Å<sup>2</sup> pa na 10 kcal/mol/Å<sup>2</sup>. U četvrtom, završnom, ciklusu optimizacije konstanta sile koja se „protivila“ promjeni oblika okosnice proteina iznosila je 5 kcal/mol/Å<sup>2</sup>, a za željezo 12 kcal/mol/Å<sup>2</sup>. Postupak minimizacije energije bio je isti za sva četiri ciklusa, najprije je u 5 000 koraka korištena metoda najbržeg silaska, a slijedio je isti broj koraka optimizacije metodom konjugiranih gradijenata.

Nakon minimizacije, sustav je zagrijavan od 0 do 300 K u intervalu od 100 ps. Tijekom zagrijavanja je sustav tretiran kao kanonski ansambl (NVT uvjeti), nakon čega je slijedilo šest ciklusa MD simulacija (svaki po 100 ps) uravnoteženja gustoće otapala (NPT uvjeti). Pri zagrijavanju, za očuvanje položaja metala i atoma okosnice proteina korištena je konstanta sile u iznosu od 32 kcal/mol/Å<sup>2</sup> koja je postepeno, tijekom uravnoteživanja gustoće vodene otopine u kojoj se nalazio enzim, smanjena na 5 kcal/mol/Å<sup>2</sup> (u preliminarnim računima pokazano je da ovaj korak ima iznimno veliku važnost pri stabilizaciji aktivnog mjesta). Kako bi se osigurala gustoća od 1,023 (± 0,001) g/cm<sup>3</sup> korišteno je izotropno skaliranje dimenzija ćelije, položaja molekula otapala i brzina atoma u sustavu. Uravnoteženi su sustavi nakon toga simulirani pri konstantnoj temperaturi (300 K) i tlaku (101 326 Pa, i NPT uvjetima) tijekom nekoliko desetaka ns. Tijekom prve nanosekunde simulacija korišteno je vrlo slabo ograničenje na gibanje metalnog iona i atoma okosnice (5 kcal/mol/Å<sup>2</sup>), dok tijekom narednih, tzv. „produktivnih simulacija“ nisu korištena nikakva ograničenja već se,

unutar zadanih NPT uvjeta, sustav mogao slobodno mijenjati. Vremenski korak tijekom uravnoteživanja i prve dvije ns produktivnih MD simulacija bio je 1 fs, a nakon toga, od treće do trinaeste ns 2 fs te ponovno 1 fs od 14 do 20 ns. Nakon toga sustav je simuliran dodatnih 20-30 ns tijekom kojih su korišteni bitno slabiji vezni parametri za ion željeza (konstante veze i kutova približno su raspolovljene u odnosu na početne vrijednosti). Temperatura je održavana konstantnom koristeći Langevinovu dinamiku s frekvencijom „sudara“ (reskaliranja brzina) od  $1 \text{ ps}^{-1}$  i vremenskim korakom od 1 fs. Veze koje uključuju vodikove atome ukružene su korištenjem SHAKE algoritma. Strukture su uzorkovane (zapisivane) periodično svaku pikosekundu, a trajektorije su analizirane pomoću modula *ptraj*. Za svaki sustav, generirane su najmanje dvije trajektorije tijekom 40-60 ns produktivnih MD simulacija (produktivne MD simulacije su simulacije koje se u pravilu koriste za računanje makroskopskih, eksperimentalno mjerivih, veličina sustava), na način da su nakon trinaeste ns puštene dvije ili tri paralelne simulacije s različitim raspodjelama stohastički pridruženih brzina (tablica 2.1.).

#### 2.1.2.1. MD simulacije kompleksa s mutiranim enzimom

Kako bismo pojasnili eksperimentalno određenu slabiju aktivnost mutiranih enzima i ispitali utjecaj pojedinih mutacija na strukturna i dinamička svojstva proteina te afinitet prema ionu željeza, *in silico* je konstruiran cijeli niz mutanata (enzima s točkastim mutacijama) za koje su provedena eksperimentalna istraživanja. Točkaste mutacije su napravljene na način da je uređivanjem *pdb* datoteke maknut ciljani aminokiselinski ostatak te su ostavljeni samo atomi koji tvore okosnicu, a oznaka aminokiseline je promijenjena u oznaku mutacijom uvedene aminokiseline (npr. kod mutiranja aminokiselinskog ostatka Tyr u Ala, obrisani su svi atomi osim C, N, C $\alpha$ , C $\beta$  i O, a oznaka ostatka je promijenjena u Ala). Nakon toga, prilikom parametrizacije, modul *tleap* je sam dodao atome koji su nedostajali kako bi novi aminokiselinski ostatak bio cjelovit.

Simulacije na fenilalaninskim mutantima (Phe59Ala, Phe115Ala i Phe119Ala) rađene su isključivo za njihove komplekse s PD, budući da je cilj istraživanja bio ispitati utjecaj mutacije hidrofobnih aminokiselinskih ostataka na stabilizaciju supstrata i aktivnost enzima. Kod ostalih mutanata (Tyr70Ala, Arg80Ala i Glu98Gln) rađene su simulacije na slobodnom proteinu (bez vezanog supstrata), na njihovim kompleksima s PD te na sustavima u kojima Fe<sup>2+</sup> ion nije inicijalno smješten u aktivno mjesto enzima, već u jedan od, tijekom MD simulacija na nativnom tipu enzima, utvrđenih vodenih tunela, odnosno na njihovim ulazima.

Postupci parametrizacije, optimizacija, uravnoteženje i MD simulacije na hidrofobnim mutantima (Phe59Ala, Phe115Ala i Phe119Ala) provedeni su identično kao na sustavu slobodnog nemutiranog proteina i njegovog kompleksa sa PD [12]. Parametrizacija na hidrofilnim mutantima (Tyr70Ala, Arg80Ala i Glu98Gln) izmijenjena je na način da je sustav postavljen u krnji oktaedar ispunjen TIP3P molekulama vode na udaljenosti od najmanje 9 Å od površine proteina te su korišteni naboji za histidinske aminokiselinske ostatke koji su dio ff12SB polja sila [76]. Optimizacija, zagrijavanje i produktivne MD simulacije izvedeni su prema istom postupku kao simulacije na hidrofobnim mutantima, a informacije o duljini trajanja i korištenom koraku dane su u tablici 2.1. Za potrebe simulacija u kojima je  $\text{Fe}^{2+}$  postavljen u tunel kojim molekule vode dolaze do aktivnog mjesta, molekula vode u tunelu koja se nalazila najbliže aminokiselinskom ostatku Tyr70 zamijenjena je s  $\text{Fe}^{2+}$  te je tako dobivena struktura poslužila kao ulaz za simulacije označene kao „tunnel“.

U tablici 2.1. navedeni su svi simulirani sustavi s enzimom Dke1 i duljina trajanja simulacija te vremenski korak koji je korišten. Osim toga navedena je i vrsta parametara koji su korišteni pri simulaciji. Računi su izvedeni na računalnom serveru Isabella [84] i hrvatskoj nacionalnoj mreži računala (CRO-NGI) [85].

Sve su simulacije izvođene su na računalnim klasterima, pomoću dvaju modula dostupnih unutar programskog paketa AMBER: *sander* za paralelno izvođene račune na standardnim procesorima i *pmemd* za račune na grafičkim procesorima [46, 67].

### 2.1.3. Simulacije izbacivanja supstrata (reaktanata i produkata) iz aktivnog mjesta

Da bi se istražili mogući putevi kojima ligandi, PD, metilglikoksal (MI) i acetat (AC) mogu napustiti odnosno ući u aktivno mjesto Dke1, rađene su RAMD simulacije. Da bi se dobili statistički značajniji rezultati za svaki simulirani kompleks rađeno je 15 RAMD simulacija, s akceleracijom u intervalu od 0,17 do 0,30 kcal/g/Å (atomske mase zadane su u g/mol).

Kako bi se istražili putevi izlaska metala iz aktivnog mjesta i približno odredila relativna brzina izbacivanja za metal vezan u različitim varijantima enzima također su korišteni RAMD računi. Za sustave WT, Glu98Gln, Arg80Ala i Tyr70Ala napravljene su po 4 simulacije za  $\text{Fe}^{2+}$  u svakom monomeru, odnosno sveukupno 54 simulacije izbacivanja  $\text{Fe}^{2+}$  iz aktivnog mjesta enzima. U svim je slučajevima korištena jednaka akceleracija 0,23 kcal/g/Å.



**Tablica 2.1.** Simulirani sustavi na kojima su rađene analize kojima se nastojalo pojasniti eksperimentalne rezultate. Uz duljinu trajanja simulacije za svaki sustav navedeni su korišteni vremenski korak i vrsta parametara (tablica 3.2. u slijedećem poglavlju)

|    | sustav<br>(položaj Fe <sup>2+</sup> ) <sup>b</sup> | duljina<br>trajanja [ns] | Parametri                 | vremenski korak<br>[fs]                   | napomena                                     |
|----|--|--------------------------|---------------------------|---|--|
| 1  | WT   | 50                       | b (0-20ns)<br>a (20-kraj) | 1 (0-2 ns; 13-20 ns)<br>2 (2-13; 20-kraj) | nakon 20. ns dvije<br>nezavisne trajektorije |
| 2  | WT – PD  | 40                       | b (0-20ns)<br>a (20-kraj) | 1 (0-2 ns; 13-20 ns)<br>2 (2-13; 20-kraj) | nakon 20. ns tri<br>nezavisne trajektorije   |
| 3  | Phe59Ala – PD                                      | 80                       | b (0-20ns)<br>a (20-kraj) | 1 (0-2 ns)<br>2 (2-kraj)                  | nakon 20. ns tri<br>nezavisne trajektorije   |
| 4  | Phe115Ala – PD                                     | 60                       | b (0-20ns)<br>a (20-kraj) | 1 (0-2 ns)<br>2 (2-kraj)                  | nakon 20. ns dvije<br>nezavisne trajektorije |
| 5  | Phe119Ala – PD                                     | 60                       | b (0-20ns)<br>a (20-kraj) | 1 (0-2 ns)<br>2 (2-kraj)                  | nakon 20. ns dvije<br>nezavisne trajektorije |
| 6  | Arg80Ala – apo <sup>c</sup>                        | 6                        |                           | 1 (0-2 ns)<br>2 (2-kraj)                  |  |
| 6  | Arg80Ala – PD                                      | 30                       | a                         | 1 (0-4 ns)<br>2 (4-kraj)                  |  |
| 7  | Arg80Ala   | 16/30                    |                           | 1 (0-4 ns)<br>2 (4-kraj)                  | dvije nezavisne<br>simulacije, 16 i 30 ns    |
| 8  | Arg80Ala –<br>(Fe <sup>2+</sup> u tunelu)          | 16                       | a                         | 1 (0-4 ns)<br>2 (4-kraj)                  |  |
| 9  | Glu98Gln – apo <sup>b</sup>                        | 6                        |                           | 1 (0-2 ns)<br>2 (2-kraj)                  |  |
| 10 | Glu98Gln – PD                                      | 30                       |                           | 1 (0-4 ns)<br>2 (4-kraj)                  |  |
| 11 | Glu98Gln   | 16/30                    |                           | 1 (0-4 ns)<br>2 (4-kraj)                  | dvije nezavisne<br>simulacije, 16 i 30 ns    |
| 12 | Glu98Gln –<br>(Fe <sup>2+</sup> u tunelu)          | 16                       | a                         | 1 (0-4 ns)<br>2 (4-kraj)                  |  |
| 13 | Tyr70Ala – apo <sup>b</sup>                        | 6                        |                           | 1 (0-2 ns)<br>2 (2-kraj)                  |  |
| 14 | Tyr70Ala – PD                                      | 30                       | a                         | 1 (0-4 ns)<br>2 (4-kraj)                  |  |
| 15 | Tyr70Ala   | 16/30                    |                           | 1 (0-4 ns)<br>2 (4-kraj)                  | dvije nezavisne<br>simulacije, 16 i 30 ns    |
| 16 | Tyr70Ala –<br>(Fe <sup>2+</sup> u tunelu)          | 16                       | a                         | 1 (0-4 ns)<br>2 (4-kraj)                  | nakon 12. ns dvije<br>nezavisne simulacije   |
| 17 | WT – apo <sup>b</sup>                              | 6                        |                           | 1 (0-2 ns)<br>2 (2-kraj)                  |  |
| 18 | WT   | 16/30                    |                           | 1 (0-4 ns)<br>2 (4-kraj)                  | dvije nezavisne<br>simulacije, 16 i 30 ns    |
| 19 | WT –<br>(Fe <sup>2+</sup> u tunelu)                | 16                       | a                         | 1 (0-4 ns)<br>2 (4-kraj)                  | nakon 12. ns tri<br>nezavisne simulacije     |

<sup>b</sup> Položaj željeznog dvovalentnog kationa naznačen je samo ukoliko se razlikuje od uobičajenog, tj. onog u aktivnom mjestu enzima (3His koordiniran Fe<sup>2+</sup>)

<sup>c</sup> apo – označava protein bez prisutnog metala.

RAMD simulacije su izvođene u trajanju od 250 ps ili dok udaljenost centara mase Dke1 i supstrata, odnosno iona željeza, nije postala veća od 30 Å. Korišten je vremenski korak od 1 fs, a isti smjer sile zadržavan je tijekom 40 koraka (40 fs). U svrhu RAMD računa konstante veznih parametara (veze, kutovi, plošni kutovi) između željeza i supstrata su zanemarene.

#### 2.1.4. GRID računi: utvrđivanje mogućih niskoenergijskih položaja za O<sub>2</sub>

Najpovoljniji položaji za molekulu kisika u aktivnom mjestu utvrđeni su pomoću programa GRID na način da su energije interakcije s enzimom računate za molekule kisika smještene u čvorovima pravilne trodimenzionalne rešetke s konstantom od 1 Å i sa središtem na ionu metala. Veličina je rešetke podešena da se proteže najmanje 10 Å u svim smjerovima od metalnog iona, što osigurava dovoljan volumen da se obuhvati čitavo vezno mjesto supstrata u Dke1 enzimu te uključi efekt proučavanih točkastih mutacija. Računi su izvođeni na optimiziranim strukturama kompleksa dobivenim nakon približno 20 ns produktivnih MD simulacija. Samo položaji pronađeni u sferi 3,1 Å od željeznog iona s interakcijskom energijom nižom od -5 kcal/mol su uzeti u obzir.

#### 2. 1. 5. Računi slobodne energije vezanja hidratiziranog Fe<sup>2+</sup> za enzim

Računi slobodne energije vezanja hidratiziranog Fe<sup>2+</sup> za protein provedeni su koristeći MM-PBSA.py [86] skriptu koja je dio programskog paketa AMBER. Računi su izvođeni na sustavima u kojima je Fe<sup>2+</sup> inicijalno postavljen u vodene tunele enzima, nativnog i njegovih mutanata: WT, Tyr70Ala, Arg80Ala i Glu98Gln. Kao ligand razmatran je Fe<sup>2+</sup> ion s dvije molekule vode koje ga okružuju, dok je receptor *apo* enzim.

#### 2. 1. 6. Strukturne analize

Analize sekundarne strukture za prirodni Dke1 i njegove mutante Tyr70Ala, Arg80Ala i Glu98Gln provedene su uz pomoć mrežnog poslužitelja STRIDE [87]. Dok su promjene u 3D strukturi enzima tijekom MD simulacija analizirane modulom *ptraj*, koji je dio programskog paketa AMBER, u vremenskom koraku 1 ps (koliko često su i uzorkovane). Analizirani su: korijen srednje vrijednosti kvadrata odstupanja uzorkovanih 3D struktura od početne, aminokiselinske fluktuacije, populacija aktivnog mjesta molekulama vode, vodikove veze između aminokiselinskih ostataka te okruženje metalnog iona.

## 2. 2. 3,4-dioksidogenaza 3hidroksiantranilne kiseline (3HAO)

### 2. 2. 1. Parametrizacija i MD simulacije

Trodimenzijska struktura humanog 3HAO preuzeta je iz PDB baze (PDB kod 2QNK). Ion  $\text{Ni}^{2+}$  koji se nalazi u aktivnom mjestu eksperimentalno (difrakcijom X-zraka) određene strukture enzima zamijenjen je s ionom željeza, uklonjeni su fosfatni ion i „kristalne“ vode, a neprirodni aminokiselinski ostatak selenometionin (koji je poslužio za dobivanje stabilne kristalne strukture) zamijenjen je metioninom.

Sustav je parametriziran kao u slučaju Dke1 enzima. Naboji za supstrat,  $\text{Fe}^{2+}$  i  $\text{O}_2$  određeni su kvantno mehaničkim računom pomoću programskog paketa Gaussian, primjenjujući isti postupak koji je opisan u poglavlju 2.1.1., dok su kao vezni parametri za  $\text{Fe}^{2+}$  korišteni oni razvijeni na Dke1 sustavu. Parametrizacija supstrata 3-Ohaa (3hidroksiantranilna kiselina) provedena je pomoću modula *antechamber*, koji je dio programskog paketa AMBER, a koji za parametrizaciju liganda koristi GAFF polje sila. Naboji na aminokiselinskim ostacima koji koordiniraju  $\text{Fe}^{2+}$  ion (2 histidina, od kojih je jedan koordinira metalni ion preko  $\text{N}_\epsilon$  a drugi preko  $\text{N}_\delta$  te 2 glutamata) preuzeti su iz AMBER ff12SB polja sila. Uklapanje (dokiranje) supstrata u vezno mjesto proteina napravljeno je pomoću programa Autodock, s tim da je pri odabiru najpovoljnijeg položaja u obzir uzet i položaj supstrata u kristalografski određenoj strukturi bakterijskog enzima (pdb kod bakterijskog 3HAO sa supstratom je 1YFY). Identičnost sljedova bakterijskog i humanog enzima iznosi oko 36%.

Za potrebe simulacije protein je uronjen u krnji oktaedar ispunjen TIP3P molekulama vode, sloj molekula vode oko proteina iznosio je najmanje  $8\text{\AA}$ , a za neutralizaciju sustava dodani su ioni  $\text{Na}^+$ .

Nakon parametrizacije sustav je optimiziran u 4 koraka metodama molekulske mehanike te zagrijan na 300 K i uravnotežen u 7 koraka. Korišten je isti postupak kao kod pripreme Dke1 za simulacije (poglavlje 2.1.2., drugi odlomak).

Nakon optimizacije i ekvibracije sustav je podvrgnut produktivnim MD simulacijama u trajanju od oko 100 ns s korakom od 2 fs. Kako bismo uravnotežili supstrat u orijentaciji koju smo smatrali najpovoljnijom za reakciju, uzevši pri tome u obzir da je tijekom simulacija supstrat pokazivao značajnu fleksibilnost, započeli smo simulacije s relativno velikim konstantama sile za metalnu vezu i valentni kut supstrata s ionom željeza,

koje smo tijekom simulacija postupno smanjivali tako da su u posljednjem intervalu od 30 ns konstante sile za vezne parametre (vezu i valentni kut) između  $\text{Fe}^{2+}$  i O supstrata iznosile 0 kcal/(mol·Å<sup>2</sup>), dakle supstrat se mogao slobodno gibati. Navedenim postupkom omogućeno je enzimu da se tijekom 70 ns MD simulacija prilagodi pretpostavljenom, produktivnom, načinu vezanja supstrata.

Simulacije u trajanju od 0,1 mikrosekunde provedene su za nativni protein, njegov kompleks sa supstratom te za mutante u kojima su aminokiselinski ostatci Arg43, Arg95 i Glu105, važni za stabilizaciju supstrata [23], mutirani u alanin.

**Tablica 2.2.** Iznos barijera (konstanti sila) veznih parametara između  $\text{Fe}^{2+}$  i supstrata u kcal/(mol·Å<sup>2</sup>), odnosno u kcal/(mol·rad<sup>2</sup>) tijekom MD simulacija. Dane su vrijednosti za nativni protein i njegove mutante.

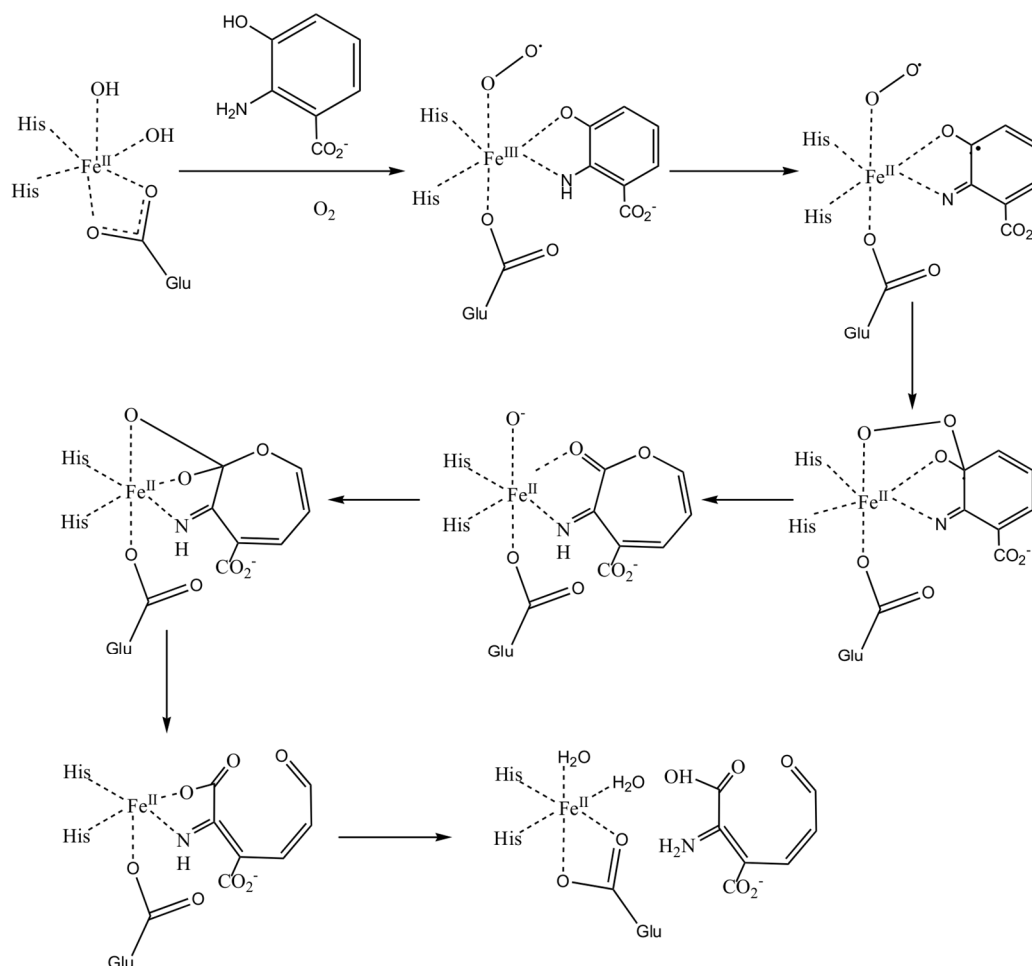
| vrijeme simulacije [ns] | iznos barijere [kcal/mol]/Å <sup>2</sup> , za parametre veze, odnosno kcal/mol/rad <sup>2</sup> za parametre kuta |            |           |            |
|-------------------------|---|------------|-----------|------------|
|                         | WT kompleks   |            | Mutanti   |            |
|                         | veza FE-O   | kut FE-O-C | veza FE-O | kut FE-O-C |
| 0-28                    | 170   | 100        | 170       | 100        |
| 28-40                   | 170   | 10         | 170       | 50         |
| 40-52                   | 170   | 5          | 170       | 20         |
| 52-76                   | 50  | 10         | 50        | 20         |
| 76-106                  | 0   | 20         | 0         | 20         |

U drugom skupu simulacija s jednakim trajanjem, za supstrat nisu primijenjeni vezni parametri tijekom cijelog trajanja simulacija. U ovom je skupu supstrat orijentiran na jednak način kao u QM/MM računima.

### 2. 2. 2. QM i QM/MM računi

Kako bismo ispitali predloženi reakcijski put [23] (shema 2.1.) 3-hidroksiantranilne kiseline pristupili smo utvrđivanju tijeka reakcije kvantno mehaničkim računom. Računi su izvođeni na modelu u kojem su osim atoma koji tvore okosnicu izostavljeni i C<sub>α</sub> (u slučaju Arg-a i C<sub>β</sub>) atom (slika 2.2.). Kako bismo upotpunili valentnu ljusku tih atoma, dodan im je H atom te su tako krajnje skupine na aminokiselinskim ostacima u modelu bile CH<sub>3</sub> skupine. Na tom je modelu utvrđen tijek reakcije i to tako da su računi provedeni bez prisutnosti otapala (plinska faza) te uz simulaciju otapala CPCM modelom. Nikakvo ograničenje na gibanje

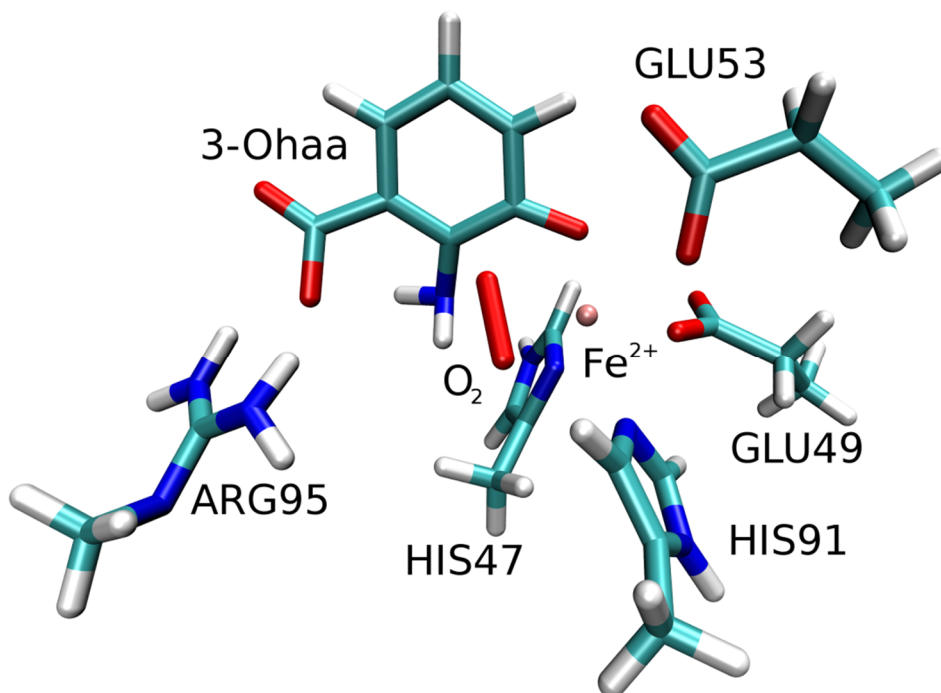
atoma nije primijenjeno, odnosno svi atomi u sustavu su se mogli slobodno pomicati pod utjecajem potencijala ostalih atoma u modelu. Dielektrična konstanta u CPCM modelu postavljena je na 4 [91], a računi su izvedeni pomoću programskog paketa Gaussian. U računima je korišten DFT funkcional te bazni skup 6-311G [92] za sve atome osim za željezni ion za koji je korišten bazni skup SDD [93].



**Shema 2.1.** Predloženi reakcijski put za oksidaciju 3-Hidroksiantranilne kiseline u 2-amino 3-mukonat kiselinu semialdehid kataliziranu od strane 3HAO enzima. Preuzeto iz *Zhang i sur.* [23]

Kao početna struktura za kombinirane kvantno mehaničke-molekulske mehaničke račune uzeta je optimizirana struktura dobivena iz MD simulacija koja je prema našoj pretpostavci imala najoptimalnije uvjete za kemijsku reakciju. Sustavu je reduciran broj molekula vode, radi učinkovitijeg korištenja računalnih resursa te je sveukupni broj atoma u inicijalnoj optimizaciji iznosio 10746, od čega je 76 atoma razmatrano QM pristupom (slika 1.9.). Za potrebe MM računa korišteno je AMBER ff99 polje sila, a za kvantno mehaničko

modeliranje „QM dijela“ korišten je kvantno mehanički B3LYP funkcional s baznim skupom 6-31G [94].



**Slika 2.2.** Okruženje  $\text{Fe}^{2+}$  iona u 3HAO enzimu, korišteno u kvantno mehaničkim računima

Iz početne, QM-MM metodom dodatno optimizirane strukture, međusobnim privlačenjem atoma duž pretpostavljene reakcijske koordinate dobivene su početne strukture za utvrđivanje prijelaznih stanja i njima pripadajućih minimuma. Za potpuni prikaz reakcije izvedeno je ukupno 5 privlačenja, a nakon dobivanja potpunog energijskog profila, izvedeni su računi s većim baznim skupovima (6-311+G(2d,p) i TZVP [95, 96]) u svrhu korekcije energijskog profila. Prijelazna stanja potvrđena su sa tri kriterija, odnosno imaju najvišu energiju duž privlačenja na reakcijskoj koordinati, jednu imaginarnu frekvenciju duž reakcijske koordinate, i IRC računi (*engl.* Intrinsic Reaction Coordinate) dovode sustav u pripadajuće minimume sa obje strane prijelaznog stanja. Cijeli profil utvrđen je korištenjem pristupa tzv. mehaničkog uklapanja. Nakon utvrđivanja profila sa ME, stacionarne točke su poslužile kao ulazi za elektronsko uklapanje.

### 3. REZULTATI

#### 3.1. Acetilaceton dioksigenaza iz *Acinetobacter Jonsoii* (Dke1)

Dke1 je o željezu ovisna dioksigenaza koja katalizira oksidativnu razgradnju  $\beta$ -diketona. U svom aktivnom obliku Dke1 je homotetramer sa po jednim ionom željeza u svakoj monomernoj jedinici. Cilj istraživanja je bio utvrditi utjecaj hidrofobnih i hidrofilnih aminokiselinskih ostataka iz aktivnog mjesta (druge koordinacijske sfere metala) na enzimsku aktivnost i afinitet Dke1 prema metalnim ionima. U tu svrhu proveli smo opsežnu računalnu studiju za nativni protein i mutante na kojima su izvršena eksperimentalna mjerenja.

Kako bi na submolekularnom nivou pojasnili mehanizam enzimske reakcije razgradnje acetil acetona koju katalizira Dke1 i pojasnili razlike u učinkovitosti katalize između nativnog (prirodnog) proteina i njegovih mutanata, istraživana je struktura slobodnog Dke1 i njegovog kompleksa sa supstratom vezanim u aktivno mjesto enzima. Koristeći MD simulacije proučavana su dinamička i strukturna svojstva eksperimentalno okarakteriziranih sustava, a zatim su rezultati dobiveni *in silico* uspoređeni s eksperimentalnim vrijednostima. Istraženi su struktura, geometrija i krutost aktivnog centra, afinitet molekula vode i kisika za vezanje u aktivno mjesto enzima. Identificirani su tuneli kojima prolaze molekule vode, ioni metala, supstrat i produkti reakcije, a ispitana su i alternativna, nespecifična, vezna mjesta za  $\text{Fe}^{2+}$  ion u proteinu.

##### 3.1.1 Određivanje parametara za MD simulacije

Budući da u AMBER poljima sila ne postoje odgovarajući parametri za ione željeza koji nisu sastavni dio hem-a, a vezani su u proteinima, trebalo ih je razviti. Parametre za željezni ion u Dke1 odredili smo koristeći Hatree-Fock (HF) kvantno mehaničke račune. Na temelju rezultata dobivenih optimizacijom modelnih sustava HF 6-311G(p,d) metodom, atomski naboji su određeni korištenjem nekoliko različitih pristupa opisanih u prethodnom poglavlju (2.1.1.) i njihove vrijednosti dane su u tablici 3.1. zajedno s Amber ff03 nabojima za histidinske aminokiselinske ostatke.

**Tablica 3.1.** Vrijednosti parcijalnih atomskih naboja (izražene preko jediničnog,  $e^+$ , naboja) utvrđenih na kvantno mehanički optimiziranom modelnom sustavu korištenjem različitih pristupa (pristupi korišteni za dobivanje naboja opisani su u METODAMA, tj u poglavlju 2.1.1)

| Ime atoma   | APT   | ESP          | Mullikan | Amber ff03 | Ime atoma              | APT   | ESP          | Mullikan |
|---|-------|--------------|----------|------------|------------------------|-------|--------------|----------|
| <b><math>\delta</math> – koordinirani histidin</b>  |       |              |          |            | <b>Supstrat (PD)</b>   |       |              |          |
| N   | -0,66 | <b>-0,79</b> | -0,70    | -0,51      | O2                     | -1,16 | <b>-0,87</b> | -0,75    |
| H   | 0,26  | <b>0,35</b>  | 0,40     | 0,35       | C1                     | 1,37  | <b>1,16</b>  | 0,64     |
| CA  | 0,22  | <b>0,59</b>  | -0,07    | 0,12       | C6                     | -0,06 | <b>-0,59</b> | -0,59    |
| HA  | 0,11  | <b>-0,01</b> | 0,25     | 0,14       | H                      | 0,00  | <b>0,15</b>  | 0,20     |
| CB  | 0,35  | <b>-0,64</b> | -0,37    | -0,12      | H1                     | 0,02  | <b>0,17</b>  | 0,21     |
| HB2   | -0,03 | <b>0,17</b>  | 0,23     | 0,09       | H2                     | -0,01 | <b>0,14</b>  | 0,20     |
| HB3   | -0,01 | <b>0,21</b>  | 0,22     | 0,09       | C3                     | -1,08 | <b>-1,10</b> | -0,58    |
| CG  | 0,06  | <b>0,46</b>  | 0,27     | 0,00       | H3                     | 0,02  | <b>0,21</b>  | 0,19     |
| ND1   | -0,40 | <b>-0,55</b> | -0,75    | -0,21      | C4                     | 1,35  | <b>0,93</b>  | 0,61     |
| HD1   | 0,32  | <b>0,44</b>  | 0,44     | 0,32       | O5                     | -1,22 | <b>-0,72</b> | -0,81    |
| CE1   | 0,35  | <b>0,29</b>  | 0,32     | 0,15       | C7                     | -0,03 | <b>-0,58</b> | -0,60    |
| HE1   | 0,12  | <b>0,12</b>  | 0,27     | 0,12       | H4                     | -0,03 | <b>0,15</b>  | 0,18     |
| NE2   | -0,62 | <b>-0,44</b> | -0,77    | -0,60      | H5                     | -0,01 | <b>0,13</b>  | 0,19     |
| CD2   | 0,01  | <b>-0,18</b> | -0,04    | 0,04       | H6                     | 0,02  | <b>0,18</b>  | 0,21     |
| HD2   | 0,14  | <b>0,17</b>  | 0,27     | 0,11       | <b>Fe<sup>2+</sup></b> |       |              |          |
| C   | 0,23  | <b>0,21</b>  | 0,51     | 0,52       | FE2                    | 1,69  | <b>1,16</b>  | 1,46     |
| O   | -0,36 | <b>-0,22</b> | -0,41    | -0,60      |                        |       |              |          |
| <b><math>\epsilon</math> –koordinirani histidin</b> |       |              |          |            |                        |       |              |          |
| N   | -0,40 | <b>-0,89</b> | -0,58    | -0,53      |                        |       |              |          |
| H   | 0,33  | <b>0,50</b>  | 0,44     | 0,28       |                        |       |              |          |
| CA  | 0,04  | <b>0,97</b>  | -0,08    | 0,03       |                        |       |              |          |
| HA  | 0,02  | <b>-0,12</b> | 0,22     | 0,09       |                        |       |              |          |
| CB  | 0,42  | <b>-0,90</b> | -0,38    | -0,15      |                        |       |              |          |
| HB2   | -0,02 | <b>0,22</b>  | 0,22     | 0,05       |                        |       |              |          |
| HB3   | -0,06 | <b>0,14</b>  | 0,19     | 0,05       |                        |       |              |          |
| CG  | 0,11  | <b>0,72</b>  | 0,24     | 0,28       |                        |       |              |          |
| ND1   | -0,58 | <b>-0,49</b> | -0,66    | -0,42      |                        |       |              |          |
| CE1   | 0,32  | <b>-0,02</b> | 0,30     | 0,03       |                        |       |              |          |
| HE1   | 0,08  | <b>0,20</b>  | 0,24     | 0,13       |                        |       |              |          |
| NE2   | -0,49 | <b>-0,23</b> | -0,73    | -0,1       |                        |       |              |          |
| HE2   | 0,28  | <b>0,35</b>  | 0,42     | 0,27       |                        |       |              |          |
| CD2   | 0,07  | <b>-0,41</b> | 0,04     | -0,30      |                        |       |              |          |
| HD2   | 0,11  | <b>0,28</b>  | 0,26     | 0,16       |                        |       |              |          |
| C   | 0,20  | <b>0,01</b>  | 0,43     | 0,66       |                        |       |              |          |
| O   | -0,43 | <b>-0,21</b> | -0,51    | -0,53      |                        |       |              |          |

U tablici 3.1. nisu prikazani AMBER ff03 naboji za željezni ion i supstrat, jer ih navedeno polje sila ne sadrži. Svaki od dobivenih skupova naboja je testiran na način da smo



proveli smo niz preliminarnih MD simulacija u kojima su korišteni navedeni naboji. Izbor naboja se temeljio analizi/očuvanju geometrije aktivnog mjesta enzima tijekom pojedinih simulacija. Odlučeno je da se za daljnje simulacije koriste isključivo ESP naboji, jer, iako su nešto niži u apsolutnom iznosu simulacije uz njihovo korištenje dobro su sačuvale geometriju aktivnog mjesta enzima. Osim toga parcijalni atomski naboji u AMBER poljima sila također su izvedeni korištenjem ESP pristupa.

Osim naboja, na modelnom sustavu su određeni i ostali parametri potrebni za izvođenje MD simulacija: iznosi duljina veza, kutova i valentnih kutova za atome koji koordiniraju ion metala te njihove pripadajuće energijske barijere. Energija koju za željezo daje kontrakcija {511111111/41111111/411} iznosi -1262,33880651 *Ha* za neutralni atom u  $^5D$  stanju. Za usporedbu: -1262.251794 *Ha* i -1262.416652 *Ha* je dobiveno korištenjem Ahlrich-ovih baznih skupova {63311/53/41} “SV” [95] i TZV baznog skupa [96]. Jedan od poznatijih {66631/6631/31/1} 6-31G\* bazni skup [97] daje -1262.139809 *Ha* za neutralni atom željeza. Kako bi se uzela u obzir istovremena interakcija  $Fe^{2+}$  sa molekulom vode, dušikom i karboksilnim kisikovim atomima, korišteni su slijedeći ligandi: PD, molekula vode, aceton (Ace), amonijak i 4-metilimidazol (MI). Optimizirane strukture modela  $Fe^{2+} \cdot 6H_2O$ ,  $Fe^{2+} \cdot 2Ace \cdot 4H_2O$ , i  $Fe \cdot 2PD \cdot 2H_2O$  pokazale su  $D_{2h}$  simetriju;  $Fe^{2+} \cdot 5H_2O$   $C_{2v}$  simetriju;  $Fe^{2+} \cdot 2MI \cdot 4H_2O$   $C_i$  simetriju; i  $Fe^{2+} \cdot 3MI \cdot 3H_2O$  i  $Fe \cdot 3NH_3 \cdot 3H_2O$   $C_3$  simetriju. Ključni sustavi za analizu su bili  $Fe \cdot 3NH_3 \cdot 3H_2O$ ,  $Fe^{2+} \cdot 6H_2O$  te  $Fe^{2+} \cdot 5H_2O$ .

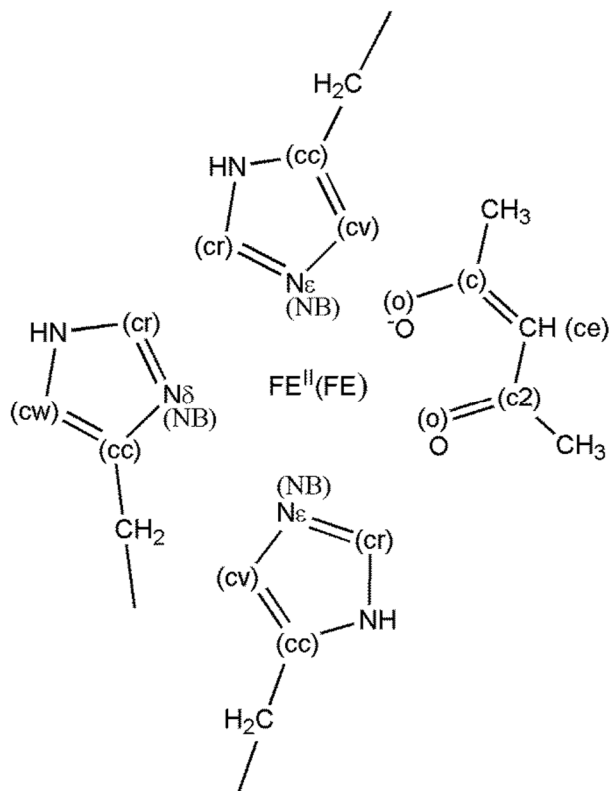
Budući da je Jahn-Tellerova distorzija [98] pojava koja je ograničena na sustave visoke simetrije, a degenerirano osnovno stanje može se s visokom pouzdanošću zanemariti u proteinima, za vrijednost uobičajene duljine veze, Fe-O korišten je prosjek dobiven računima na različitim modelnim sustavima (u rasponu od 2,1016 Å do 2,2660 Å). Diferencijacija jačine interakcija iona željeza s atomima kisika iz različitih funkcionalnih grupa dobiva se uključivanjem elektrostatske interakcije.

$Fe^{2+} \cdot 5H_2O$  sustav je generiran iz  $Fe^{2+} \cdot 6H_2O$  brisanjem jedne molekule vode. Zanimljivo je primijetiti da se struktura nije značajnije promijenila tijekom UHF optimizacije geometrije i konvergirala je prema distorziranoj piramidalnoj geometriji s Fe-O udaljenostima od 2,1827 Å (za aksijalne kisike), 2,1716 Å i 2,1016 Å (za ekvatorijalne kisike) te s O–Fe–O kutovima od 92.29° i 106.25°. Oktaedarni oblik koordinacijske za  $Fe^{2+}$  se iz toga razloga čini vrlo stabilnim, čak i ako jedan položaj ostane prazan.

$\text{Fe}^{2+} \cdot 3\text{NH}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , model imao je tri molekule amonijaka s „gornje“ strane iona željeza, a tri molekule vode s donje strane. Konvergirana struktura imala je  $C_3$  simetriju s udaljenostima 2,2660 Å (Fe–O) i 2,2736 Å (Fe–N) te s valentnim kutovima 83,65° (O–Fe–O), 96,45° (N–Fe–N) i 88,01°/170,82° (O–Fe–N). Ista primjedba kao i za Fe–O udaljenosti u sustavu  $\text{Fe}^{2+} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  vrijedi za O–Fe–N kut: niti jedno polje sila, koje se temelji na harmoničkim članovima s jednoznačnim vrijednostima za ravnotežne udaljenosti ili kutove, ne može ispravno modelirati takvu situaciju u kojoj kut između 3 istovrsna atoma može poprimiti dvije različite vrijednosti koje se ne mogu povezati nekom od periodičnih funkcija. Kako bilo, tijekom testiranja je utvrđeno da vrijednost parametra za valentni kut između atoma koji koordiniraju željezo nije ključna za očuvanje geometrije, pa je O–Fe–N konstanta sile reducirana na malu vrijednost.

Za račun konstanti sila ( $K_r$ ), pored UHF optimiziranih modelnih sustava, tj. njihovih energija, korišteni su sustavi s neznatno distorziranim geometrijama (ranije navedeni optimizirani modelni sustavi su:  $\text{Fe}^{2+} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Fe}^{2+} \cdot 2\text{Ace} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Fe} \cdot 2\text{PD} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{Fe}^{2+} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{Fe}^{2+} \cdot 2\text{MI} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{Fe}^{2+} \cdot 3\text{MI} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  i  $\text{Fe}^{2+} \cdot 3\text{NH}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ). Navedena procedura, primijenjena je na sve modelne sustave koji imaju određenu vezu za koju je trebalo odrediti parametre, a detaljno je opisana za  $\text{Fe}^{2+} \cdot 2\text{Ace} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  modelni sustav. Počevši od optimiziranih Fe–O udaljenosti: 2,1696 Å (Ace), 2,1795 i 2,1885 Å ( $\text{H}_2\text{O}$ ), u jednom računu su po dvije molekule acetona istovremeno odmaknute od željeza za 0,01 Å, dok su ostale molekule zadržane u svojim početnim položajima. Slično, u drugom računu aceton i jedan par molekula vode su zadržani u početnom položaju, a položaji dviju preostalih molekula vode su promijenjeni za 0,01 Å i to, u smjeru iona željeza, pa od njega; isti postupak ponovljen je i za drugi par molekula vode. Pomak od 0,01 Å je istog reda veličine kao i pomaci u geometriji koji se koriste u programu GAMESS pri numeričkim računima Hessianove matrice i pretpostavlja se da je dovoljno malen da ne proizvodi dodatne nepoželjne efekte u promatranom sustavu. Razlike u energijama između triju distorziranih i ne distorzirane strukture daju konstante „AMBER polja sila“  $K_r$  s vrijednostima 49 i 53 kcal/mol/Å<sup>2</sup> za Fe–O (voda) i 43 kcal/mol/Å<sup>2</sup> za Fe–O (AC). Fe–O udaljenosti u sustavima  $\text{Fe}^{2+} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  i  $\text{Fe}^{2+} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , su slične. Naime dok su kisik u vodi i kisik u acetonu uključeni u različite vrste vezanja unutar samih supstituenata, vezanje između oba tipa kisikovih atoma i željeznog iona je vrlo slično. To je e<sup>–</sup> donor-akceptor veza između željeza i kisika. Situacija je slična u slučaju Fe–N veze:  $\text{Fe}^{2+} \cdot 3\text{NH}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , pomak  $\text{NH}_3$  za 0,01 Å daje „AMBER konstantu sile“ od 63 kcal/mol/Å<sup>2</sup>; za  $\text{Fe}^{2+} \cdot 2\text{MI} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  i  $\text{Fe}^{2+} \cdot 3\text{MI} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  sustave pomak MI za 0,01 Å daje

„AMBER konstantu sile“ od 68 i 80 kcal/mol/Å<sup>2</sup>. Za konstante kutova  $K_\theta$  korišten je sličan pristup s pomacima od 1°. Tako je u  $\text{Fe}^{2+} \cdot 3\text{NH}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  sustavu, O–Fe–O kut reduciran na 82,65°, a u drugom računu N–Fe–N kut je reduciran na 95,45°. Za torzijske kutove jedan prsten u  $\text{Fe}^{2+} \cdot 3\text{MI} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  rotiran je za 5°, a karboksilni kisici u  $\text{Fe}^{2+} \cdot 2\text{PD} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  pomaknuti su iz ravnine za 0,1Å.



**Slika 3.1.** Aminokiselinski ostatci i supstrat (acetil aceton) koji koordiniraju ion željeza. Atomi za koje su razvijeni novi parametri označeni su prema tipovima (oznake u zagradama)

Konačni parametri dobiveni su usrednjavanjem vrijednosti dobivenih na modelnim sustavima kako je opisano. Vrijednosti pojedinih parametara dane su u tablici 3.2., s tim da su interakcije Fe–O i Fe–N opisane i s veznim i s neveznim parametrima, dok su sve ostale interakcije opisane samo s neveznim parametrima. Imena atoma, koji su sastavni dio aminokiselina i supstrata, kako ih koristi AMBER polje sila dana su na shemi na slici 3.1. Pri razvoju parametara aminokiselinskim ostacima koji koordiniraju  $\text{Fe}^{2+}$  pridružena su imena koja se razlikuju od standardnih imena u AMBER polju sila, iz razloga jer su navedeni parametri primijenjeni samo za atome u koordinacijskoj sferi  $\text{Fe}^{2+}$ , ali ne i u ostatku proteina.

**Tablica 3.2.** Dva skupa parametara za  $\text{Fe}^{2+}$  korištena u MD simulacijama a) vrijednosti dobivene *ab initio* računima; b) vrijednosti dobivene proizvoljnim iterativnim podešavanjem (korištene tijekom početnih 20 ns simulacija). Vrijednosti naboja dane su u tablici 3.1.

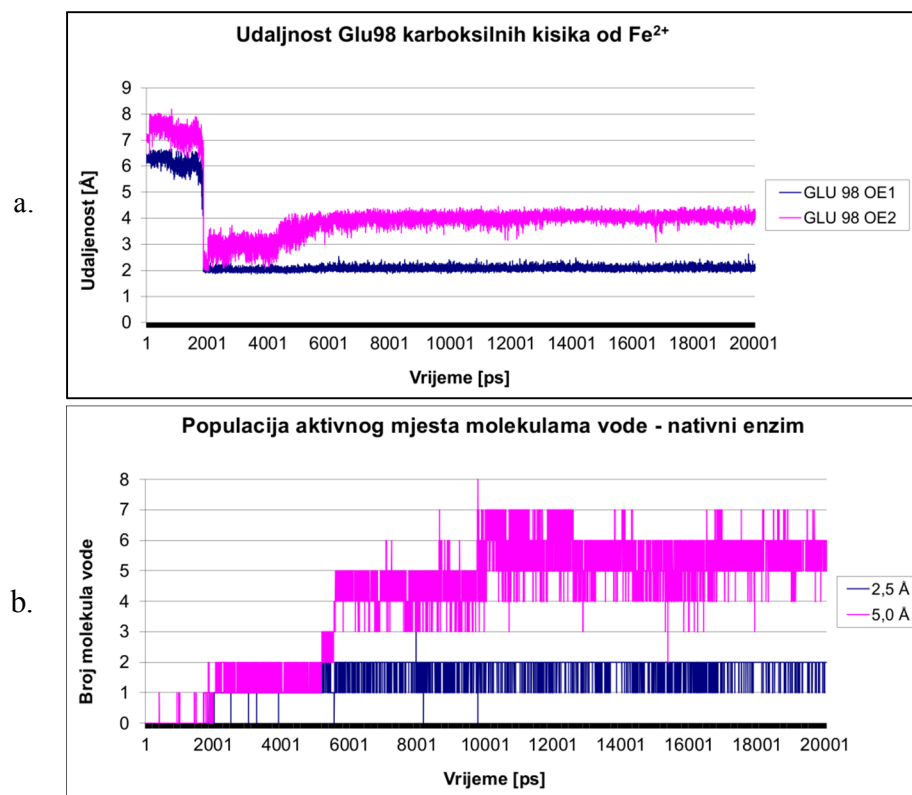
| Vezni parametri           |  |       |   |       |              |   |
|---------------------------|--|-------|---|-------|--------------|---|
| Parametri za duljinu veze |  |       |   |       |              |   |
| Veza                      | Ravnotežna vrijednost [ $\text{\AA}$ ]                     |       | Konstanta sile [ $\text{kcal mol}^{-1} \text{\AA}^{-2}$ ]             |       |              |   |
|                           | a  | b     | a   | b     |              |   |
| FE–o                      | 2,14   | 2,07  | 42,5  | 170,0 |              |   |
| FE–NB                     | 2,27   | 2,16  | 70,0  | 175,0 |              |   |
| Parametri za duljinu veze |  |       |   |       |              |   |
| Veza                      | Ravnotežna vrijednost [ $^{\circ}$ ]                       |       | Konstanta sile [ $\text{kcal mol}^{-1} \text{rad}^{-2}$ ]             |       |              |   |
|                           | a  | b     | a   | b     |              |   |
| NB–FE–NB                  | 90,0   | 90,0  | 49,0  | 285,0 |              |   |
| o–FE–o                    | 90,0   | 90,0  | 110,0   | 250,0 |              |   |
| o–FE–NB                   | 90,0   | 90,0  | 1,0   | 1,0   |              |   |
| FE–NB–CC                  | 127,0  | 127,0 | 25,0  | 100,0 |              |   |
| FE–NB–CR                  | 127,0  | 127,0 | 25,0  | 100,0 |              |   |
| FE–NB–CV                  | 127,0  | 127,0 | 25,0  | 100,0 |              |   |
| FE–o–c                    | 180,0  | 127,0 | 53,0  | 100,0 |              |   |
| FE–o–c2                   | 180,0  | 127,0 | 53,0  | 100,0 |              |   |
| o–c2–ce                   | 129,0  | 129,0 | 49,0  | 71,0  |              |   |
| Parametri za duljinu veze |  |       |   |       |              |   |
| Veza                      | visina barijere [ $\text{kcal mol}^{-1} \text{rad}^{-2}$ ] |       | faza [ $^{\circ}$ ]   |       | periodičnost |   |
|                           | a  | b     | A   | a     | a            | b |
| X–NB–FE–X                 | 0,0  | 0,0   | A   | b     | 2            | 2 |
| FE–o–c2–X                 | 0,0  | 0,0   | 0,0   | 0,0   | 2            | 2 |
| FE–o–c–X                  | 0,0  | 0,0   | 180,0   | 180,0 | 2            | 2 |
| X–o–FE–X                  | 0,0  | 0,0   | 180,0   | 180,0 | 2            | 2 |
| c–o–FE–o                  | 13,2   | 8,3   | 180,0   | 180,0 | 2            | 1 |
| c2–o–FE–o                 | 13,2   | 8,3   | 180,0   | 180,0 | 2            | 1 |
| FE–NB–CR–NA               | 12,5   | 90,0  | 180,0   | 180,0 | 1            | 1 |
| Nevezni parametri         |  |       |   |       |              |   |
| Atom                      | Atomski radijus [ $\text{\AA}$ ]                           |       | Visina energijske barijere [ $\text{kcal mol}^{-1} \text{\AA}^{-2}$ ] |       |              |   |
| FE                        | 1,2  |       | 0,05  |       |              |   |

Razlog postojanju dviju verzija parametara je taj da su najprije parametri računati isključivo na sustavu dobivenom iz realnog okruženja proteina u Dke1 enzimu (b inačica parametara) i praćenjem geometrije aktivnog mjesta tijekom simulacija. Naime kako bi spriječili udaljavanje koordinirajućih aminokiselnih ostataka od iona željeza tijekom simulacija konstante sile iterativno smo mijenjali (povećavali). Primjenom novih (ESP)

naboja, produljenog trajanja uravnoteženja sustava i postupnim popuštanjem ograničenja na gibanje (opisano u poglavlju 2.1.2.) dobru geometriju veznog mjesta tijekom simulacija dobivali smo i s nižim vrijednostima konstanti sila te smo u ostatku simulacija koristili parametre određene kvantno mehaničkim računom na modelnim sustavima prema gore navedenom postupku („a“ inačica parametara u tablici 3.2).

### 3.1.2. Simulacija nativnog proteina i njegovog kompleksa s 2,4-pentandionom

Dvije nezavisne MD simulacije su izvedene (u trajanju od 50 i 19,5 ns, tablica 2.1., redak 1) za slobodni protein, a tri nezavisne simulacije (u trajanju od 40, 20 i 19,5 ns; tablica 2.1. redak 2) za njegov kompleks s PD.

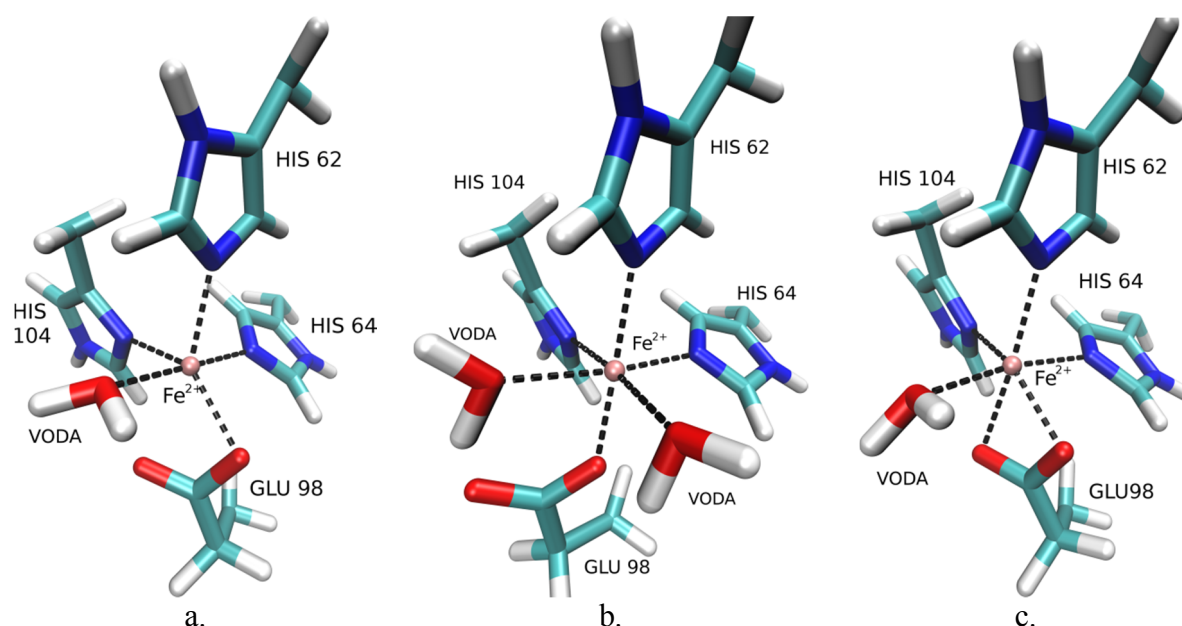


**Slika 3.2. a.** Udaljenost između atoma karboksilnih kisika Glu98 i metalnog iona tijekom prvih 20 ns MD simulacija; **b.** broj molekula vode unutar 2,5 Å od Fe<sup>2+</sup> tijekom prvih 20 ns simulacija. Prikazani su grafovi za podjedinicu A, a slične vrijednosti također su utvrđene i za ostale podjedinice.

#### 3.1.2.1. Prva koordinacijska sfera i hidrofilna trijada

U kristalnoj strukturi slobodnog Dke1 (PDB-kod 3BAL), metalni ion koordiniran je s tri histidinska aminokiselinska ostatka, His62, His64 i His104, pri čemu His62 i His64

koordiniraju metalni ion preko  $N_{\delta}$ , a His104 preko  $N_{\epsilon}$ . Tijekom MD simulacija geometrija prve koordinacijske sfere željeza se mijenja između dva načina koordinacije, od kojih je prvi distorzirana oktaedarna, a drugi trigonalna bipiramidalna koordinacija. Najprije se reorijentira bočni lanac Glu98 (rotacija oko  $C_{\beta}$ - $C_{\gamma}$  i  $C_{\gamma}$ - $C_{\delta}$  veza) i jedan (ponekada oba) njegova karboksilna kisika ulaze u  $Fe^{2+}$  koordinacijsku sferu. Postepeno (gotovo u isto vrijeme) jedna ili dvije molekule vode ulaze u vezno mjesto metala (slika 3.2.) te se uspostavlja koordinacija s pet ili šest liganda (slika 3.3.). Nakon nekoliko nanosekundi (5,2 u lancu A; 17,2 u B lancu; 1,4 u C lancu i 3,8 u D lancu) druga molekula vode prilazi  $Fe^{2+}$  ionu i zamjenjuje jedan od karboksilnih atoma kisika Glu98 u prvoj koordinacijskoj sferi željeza (slika 3.2.b.).

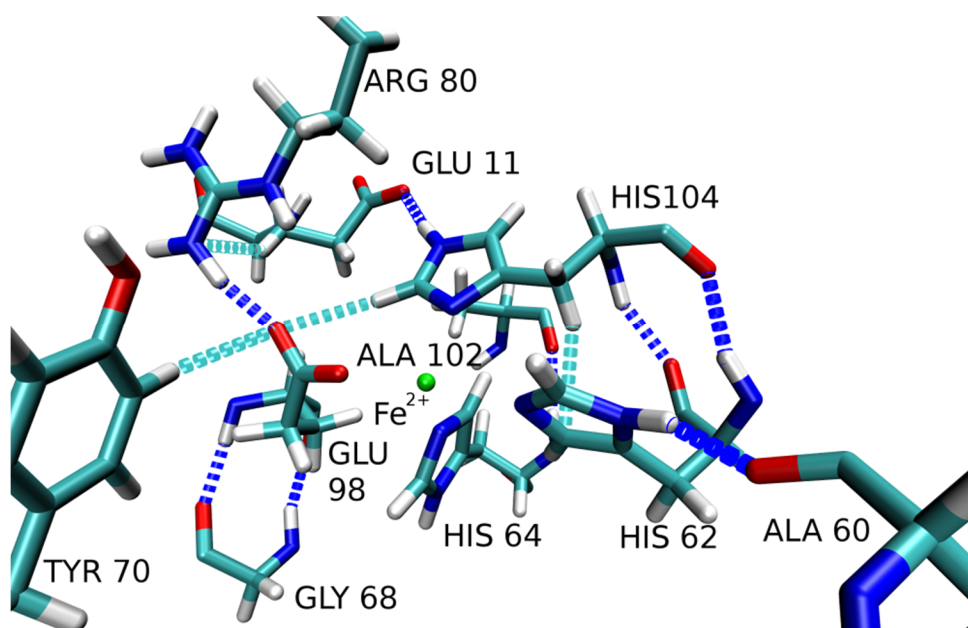


**Slika 3.3.** Tipovi koordinacije  $Fe^{2+}$  u nativnom Dke1 koji se javljaju tijekom MD simulacija.  $Fe^{2+}$  je pentakoordiniran tijekom 23% cjelokupnog vremena simulacije (a). Oktaedarna koordinacija željeznog kationa s jednim od Glu98 kisika u ekvatorijalnoj ravnini, a s drugim u aksijalnom položaju, nasuprot  $N_{\epsilon}$  atomu His62, prisutna je oko 28% cjelokupnog vremena simulacije (b), dok je struktura s dvije molekule vode, His104 ( $N_{\delta}$ ) i His64 ( $N_{\epsilon}$ ) u ekvatorijalnoj ravnini, a s Glu98 (O) i His62 ( $N_{\epsilon}$ ) u aksijalnom položaju (c) prisutna oko 49% vremena. Aminokiselinski ostatci koji koordiniraju metalni ion prikazani su u štapićastoj reprezentaciji, dok je  $Fe^{2+}$  prikazan kao ružičasta kuglica. Crnim isprekidanim linijama označena je koordinacija željeznog dikationa s atomima okolnih liganda; smatra se da atom koordinira metalni ion ukoliko je njihova udaljenost  $\leq 2,5 \text{ \AA}$ .

Takav način koordinacije, uz suptilnu uzajamnu izmjenu molekula vode koje se nalaze u koordinacijskoj sferi željeza, zadržan je tijekom sljedećeg perioda (oko 15 ns) MD

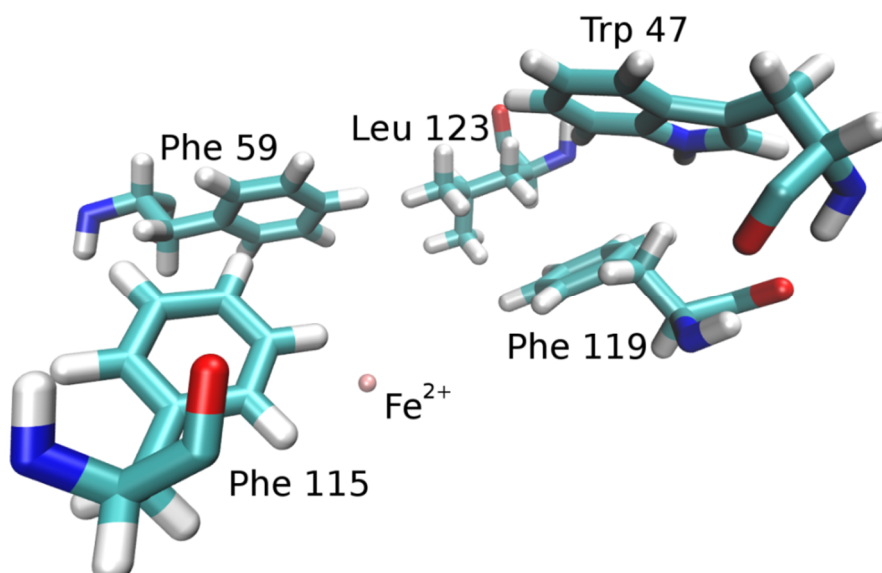
simulacija. Sličan scenarij odvijao se i u preostalim podjedinicama, uz vremenski odmak od 2 ns u podjedinici D.

Konačna struktura veznog mjesta metala je stabilizirana preko vodikovih veza, ili/i mreže jakih elektrostatskih interakcija, Tyr70 – Arg80 – Glu98 – Gly68 (tablica 3.3.), kao i preko van der Waalsovih i elektrostatskih interakcija između aminokiselinskih ostataka iz prve koordinacijske sfere i susjednih aminokiselinskih ostataka. Karboksilni kisik Glu98 je vezan vodikovom vezom za Arg80 gvanidino grupu, a preko svoje okosnice za Gly68. S bočnim lancima His64 i His104, Glu98 intereagira elektrostatski (slika 3.4.). Vodikovom vezom povezani su amidni dušik His64 i karbonilna grupa Ala102 te imidazol His104 i karboksilni kisik Glu11 iz susjedne podjedinice. Okosnice His62 i His104 međusobno su vezane dvjema jakim vodikovim vezama. Tijekom 59% vremena 50 ns duge MD simulacije, His62 je interagirao s karbonilnom grupom Ala60 tvoreći slabu vodikovu vezu (slika 3.4.).



**Slika 3.4.** Mreža vodikovih veza u podjedinici A slobodnog (bez vezanog supstrata), nemutiranog proteina nakon 20 ns MD simulacija. Aminokiselinski ostatci prikazani su u štapićastoj reprezentaciji, dok je Fe<sup>2+</sup> prikazan kao zelena kuglica. Vodikove veze i jake elektrostatske interakcije su prikazane isprekidanim linijama, obojanim tamno plavo (vodikove veze) i svijetlo plavo (jake elektrostatske interakcije). Postojanost svake navedene vodikove veze je dana u tablici 3.3.. Aminokiselinski ostatak Glu11 pripada susjednoj podjedinici (B).

Aminokiselinski ostatci Phe115 i Phe59 koji, zajedno s Leu123 i Phe119, formiraju hidrofobno područje na jednoj strani veznog mjesta supstrata interagiraju preko van der Waalsovih veza i slabe CH- $\pi$  (*engl.* face-to-edge) interakcije, dok su Leu123 i Phe119 stabilizirani preko CH- $\pi$  i van der Waalsovih interakcija s Trp47 iz drugog (hidrofobnog) dijela aktivnog mjesta (slika 3.5.)



**Slika 3.5.** Interakcija između aminokiselinskih ostataka Phe115, Phe59, Leu123, Phe119 i Trp47, koji tvore hidrofobno vezno mjesto. Prikazan je njihov položaj u podjedinici A sustava bez vezanog supstrata, nakon 20 ns MD simulacija; slična orijentacija navedenih aminokiselinskih ostataka sačuvana je u svim podjedinicama tijekom čitavih 40 ns trajanja MD simulacije.



**Tablica 3.3.** Vodikove veze, za koje se pretpostavlja da imaju važnu ulogu za stabilizaciju aktivnog mjesta, u sustavima s nativnim enzimom (bez i s vezanim supstratom) i u kompleksima fenilalaninskih mutanata s PD. Svi aminokiselinski ostatci pripadaju istoj podjedinici, osim Glu11 koji pripada susjednoj. WT – oznaka za nativni tip proteina.

| WT - slo           |               |     | WT - kom       |                |    | Phe59Ala - kom |                |    | Phe115Ala - kom |                |    | Phe119Ala - kom |                |    |
|--------------------|---------------|-----|----------------|----------------|----|----------------|----------------|----|-----------------|----------------|----|-----------------|----------------|----|
| Glu98 - His104 (%) |               |     |                |                |    |                |                |    |                 |                |    |                 |                |    |
|                    |               |     | Glu98 (OE1(2)) | His104 (NE2)   | 53 | Glu98 (OE1(2)) | His104 (NE2)   | 14 | Glu98 (OE1(2))  | His104 (NE2)   | 35 | Glu98 (OE1(2))  | His104 (NE2)   | 9  |
| Arg80 - Glu98 (%)  |               |     |                |                |    |                |                |    |                 |                |    |                 |                |    |
| Arg80 (NE)         | Glu98(OE1(2)) | 63  | Arg80 (NE)     | Glu98 (OE1(2)) | 34 | Arg80 (NE)     | Glu98 (OE1(2)) | 27 | Arg80 (NE)      | Glu98 (OE1(2)) | 39 | Arg80 (NE)      | Glu98 (OE1(2)) | 75 |
| Arg80 (NH2)        | Glu98(OE1(2)) | 64  | Arg80 (NH2)    | Glu98 (OE1(2)) | 20 | Arg80 (NH2)    | Glu98 (OE1(2)) | 39 | Arg80 (NH2)     | Glu98 (OE1(2)) | 38 | Arg80 (NH2)     | Glu98 (OE1(2)) | 72 |
| Arg80 - Tyr70 (%)  |               |     |                |                |    |                |                |    |                 |                |    |                 |                |    |
| Arg80 (NH2)        | Tyr70 (OH)    | 25  | Arg80 (NH2)    | Tyr70 (OH)     | 14 | Arg80 (NH2)    | Tyr70 (OH)     | 12 | Arg80 (NH2)     | Tyr70 (OH)     | 12 | Arg80 (NH2)     | Tyr70 (OH)     | 3  |
| Gly68 - Glu98 (%)  |               |     |                |                |    |                |                |    |                 |                |    |                 |                |    |
| Gly68 (O)          | Glu98 (N)     | 100 | Gly68 (O)      | Glu98 (N)      | 74 | Gly68 (O)      | Glu98 (N)      | 87 | Gly68 (O)       | Glu98 (N)      | 64 | Gly68 (O)       | Glu98 (N)      | 87 |
| Gly68 (O)          | Glu98 (CG)    | 5   |                |                |    |                |                |    | Gly68 (O)       | Glu98 (CG)     | 13 | Gly68 (O)       | Glu98 (CG)     | 8  |
| Glu98 - Tyr70 (%)  |               |     |                |                |    |                |                |    |                 |                |    |                 |                |    |
| Glu98 (OE1(2))     | Tyr70 (OH)    | 20  | Glu98 (OE1(2)) | Tyr70 (OH)     | 4  | Glu98 (OE1(2)) | Tyr70 (OH)     | 11 | Glu98 (OE1(2))  | Tyr70 (OH)     | 24 | Glu98 (OE1(2))  | Tyr70 (OH)     | 41 |
| Glu11 - Arg80 (%)  |               |     |                |                |    |                |                |    |                 |                |    |                 |                |    |
| Glu11 (OE1(2))     | Arg80 (NH1)   | 1   | Glu11 (OE1(2)) | Arg80 (NH1)    | 12 | Glu11 (OE1(2)) | Arg80 (NH1)    | 1  | Glu11 (OE1(2))  | Arg80 (NH1)    | 2  | Glu11 (OE1(2))  | Arg80 (NH1)    | 9  |
| Glu11 (OE1(2))     | Arg80 (NH2)   | 4   | Glu11 (OE1(2)) | Arg80 (NH2)    | 13 | Glu11 (OE1(2)) | Arg80 (NH2)    | 47 | Glu11 (OE1(2))  | Arg80 (NH2)    | 9  | Glu11 (OE1(2))  | Arg80 (NH2)    | 23 |
| Glu11 (OE1(2))     | Arg80 (NE)    | 5   | Glu11 (OE1(2)) | Arg80 (NE)     | 11 | Glu11 (OE1(2)) | Arg80 (NE)     | 33 | Glu11 (OE1(2))  | Arg80 (NE)     | 13 | Glu11 (OE1(2))  | Arg80 (NE)     | 17 |
| Glu11 - His104 (%) |               |     |                |                |    |                |                |    |                 |                |    |                 |                |    |
| Glu11 (OE1(2))     | His104 (NE2)  | 84  | Glu11 (OE1(2)) | His104 (NE2)   | 3  | Glu11 (OE1(2)) | His104 (NE2)   | 57 | Glu11 (OE1(2))  | His104 (NE2)   | 1  | Glu11 (OE1(2))  | His104 (NE2)   | 35 |

Prikazan je postotak (%) cjelokupnog vremena produktivnih MD simulacija, tijekom kojih je određena interakcija postojala. Interakcija je specificirana kao vodikova veza ukoliko je udaljenost između vodik donora i akceptora bila manja od 3,7 Å te ako je odstupanje donor-vodik-akceptor kuta od idealnog (180°) bilo manje od 60°. Kao jaka elektrostatska interakcija definirana je interakcija kod koje je promatrani par atoma na udaljenosti manjoj/jednako od 3,7 Å.

Tijekom simulacija nativnog Dke1 kao i njegovog kompleksa s PD,  $\text{Fe}^{2+}$  ion je uglavnom bio heksakoordiniran (distorzirana oktaedralna koordinacija), s penta-koordiniranom formom prisutnom tijekom otprilike jedne petine trajanja simulacija. Ovakvi rezultati se izvrsno poklapaju s eksperimentalnim, spektroskopskim rezultatima [14] koji upućuju na heksakoordinirani metalni centar kod prirodnog nemutiranog enzima te na mješavinu između penta- i heksakoordinacije kod kompleksa Dke1 s PD. U istome je radu pretpostavljeno da aminokiselinski ostatak Glu98 u nativnom tipu Dke1 ne koordinira ion željeza već stabilizira molekulu vode vezanu za metal. Različito od navedenih pretpostavki, rezultati MD simulacija upućuju na ulogu Glu98 u neposrednoj koordinaciji metala, pri čemu se u hidrofobnoj jezgri proteina uspostavlja elektrostatski neutralniji metalni centar. Sličan oblik koordinacije postoji u eksperimentalno određenim trodimenzionalnim (3D) strukturama Fe(III)-kvercitin dioksigenaze [99] (struktura određena difrakcijom X-zraka) i Fe(II)-acireduktom dioksigenaze<sup>d</sup> (struktura određena metodom Nuklearne Magnetske Rezonancije) u kojima u koordinaciji metala ( $\text{Fe}^{2+}$ ) sudjeluju tri histidina i karboksilna skupina glutaminske kiseline, što je usporedivo s rezultatima MD simulacija. Kako bi se postigla oktaedarna koordinacija iona željeza, pored aminokiselinskih ostataka u koordinaciji željeznih iona u navedenim strukturama sudjeluju ligand, odnosno molekule vode.

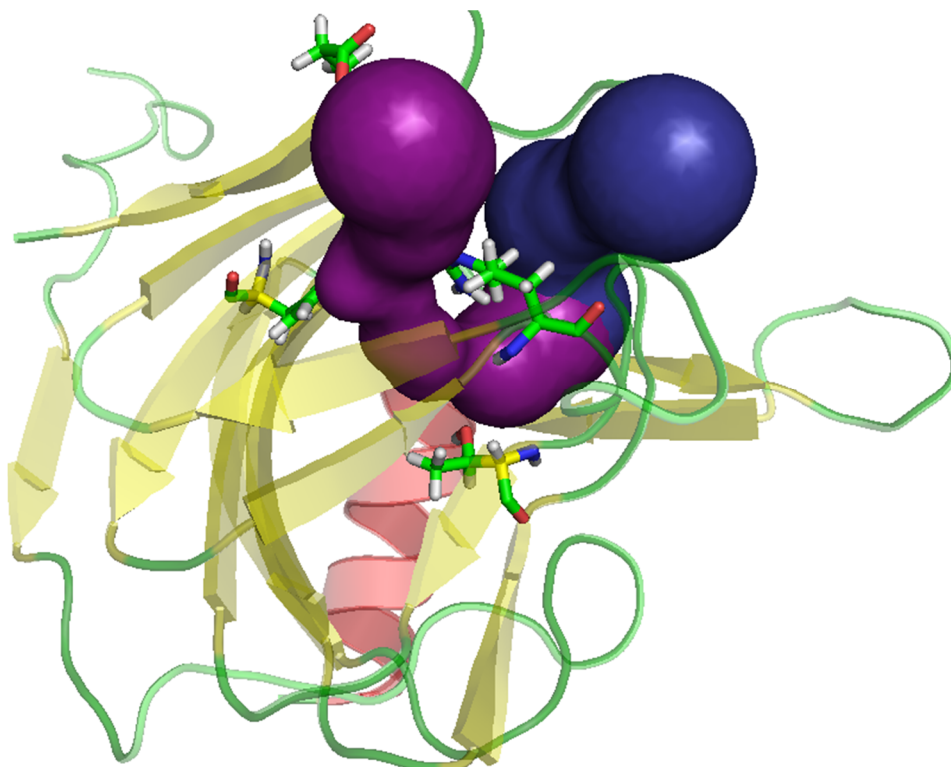
Eksperimentalno je utvrđeno da do redukcije molekule kisika na mononuklearnom metalnom centru Dke1 enzima može doći samo ukoliko je u aktivno mjesto vezan supstrat (PD). Molekulske dinamičke simulacije su pokazale da vezanjem supstrata u aktivno mjesto enzima dolazi do eliminacije Glu98 iz prve koordinacijske sfere metalnog iona, tako da katalitički kompetentno aktivno mjesto upućuje na  $\text{Fe}^{2+}$  centar koordiniran sa tri histidina.

### 3.1.2.2. Kanali za molekule vode

Analizom mreže vodikovih veza koje tijekom MD simulacija nastaju među molekulama vode u proteinu utvrđeno je postojanje dvaju „vodenih kanala“, T1 i T2. Tijekom prvih 30 ns simulacija molekule vode za dolazak do aktivnog mjesta koriste isključivo kanal T2. Ali kako se razmak između dviju beta ploča, koje definiraju ulaz u kanal T1, polako povećava tijekom simulacija, tijekom zadnjih 10 ns simulacija molekule vode za dolazak do aktivnog mjesta često koriste i taj kanal (slika 3.6.). Arg80 nalazi se na granici između ulaza u kanale T1 i T2 (slika 3.6.).

---

<sup>d</sup> Strukture kvercitin 2,3-dioksigenaze iz *Bacillus subtilis* (PDB kod 1Y3T) koja sadrži Fe(III) i acireduktom dioksigenazu iz *Klebsiella oxytoca* (PDB kod 2HJI) sa Fe(II) i ligandom.



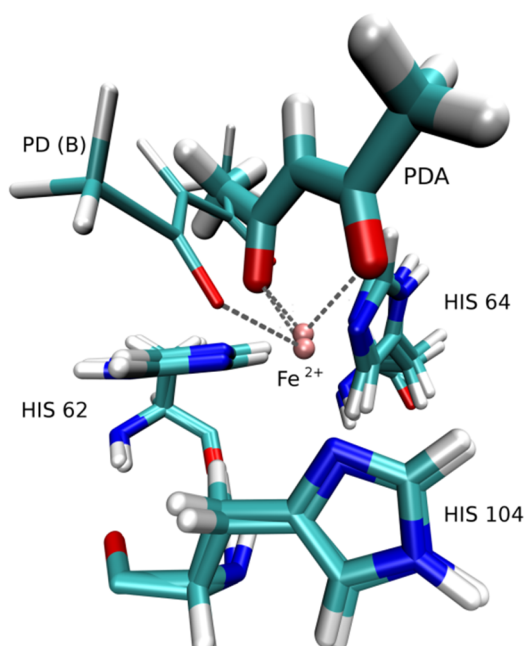
**Slika 3.6.** Tuneli/kanali (T1 i T2) kojima molekule vode putuju iz otapala u aktivno mjesto proteina i ključni aminokiselinski ostatci (prikazani kao štapići) kojima su navedeni tuneli definirani. Tuneli su za potrebe vizualizacije prikazani kao cijevi različitog promjera definiranog najvećom mogućom kuglicom koja se u statičkoj slici proteina može smjestiti na položajima duž mreže vodikovih veza koju čine molekule vode. Površina tunela T1 je obojena plavo, a tunela T2 purpurnocrveno. Tuneli su računati u podjedinici A na strukturi bez vezanog supstrata, nakon 40 ns MD simulacija. Kanal T1 je dug oko 15 Å, a širok prosječno 2,6 Å, a T2 je dug 23 Å s prosječnom širinom od oko 2 Å.

T1 ulazi u aktivno mjesto usporedno s petljom između dviju beta ploča koje sadrže aminokiselinske ostatke Thr107 i Gly105. T2 prolazi pored aminokiselinskih ostataka Glu11 i Glu12 (iz susjedne podjedinice) te pored Tyr70 nastavlja do aktivnog mjesta.

### 3.1.3. Kompleks Dke1 sa supstratom

Početna orijentacija supstrata u Dke1 veznom mjestu neznatno se izmijenila tijekom simulacija i na posljetku je stabilizirana u jednom od dva načina vezanja prikazana na slici 3.7. U obje orijentacije supstrat (PD) koordinira ion željeza bidentatno i tvori distorziranu oktaedarnu koordinaciju zajedno s tri histidina i jednom molekulom vode. U daljnjim

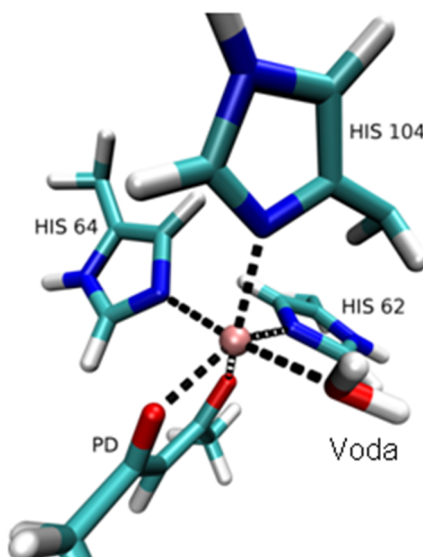
računima analiziran je samo zastupljeniji (prisutan tijekom 80% vremena simulacije kompleksa) način vezanja.



**Slika 3.7.**Superozicija (preklop) aktivnih mjesta enzima s vezanim supstratom iz dva, tijekom MD simulacija, dobivena karakteristična konformera, u kojima se način vezanja supstrata (PD) razlikuje. „Vezni mod“ A (pronađen u 80% slučajeva) prikazan je u debljoj štapićastoj reprezentaciji, a „vezni mod“ B (utvrđen u približno 20% slučajeva) prikazan je u tanjoj reprezentaciji. Tijekom MD simulacija samo je u jednoj strukturi nađen način vezanja različit od prikazanih. Radi zornosti prikaza, molekula vode koja koordinira  $\text{Fe}^{2+}$  nije prikazana. Crnom isprekidanom linijom naznačena je koordinacija metala atomima supstrata.

#### 3.1.3.1. Prva koordinacijska sfera i hidrofilna trijada

U kompleksu između prirodnog proteina i PD, oktaedarna koordinacija željeznog kationa je uspostavljena preko tri histidinska aminokiselinska ostatka, dva atoma kisika supstrata, i jedne molekule vode (slika 3.8.). Tijekom MD simulacija  $\text{Fe}^{2+}$  je dominantno heksakoordiniran. Prema spektroskopskim rezultatima [14], postoji mješavina aktivnih mjesta sa i bez šestog liganda (molekula vode). Uvažimo li pretpostavku da je jaki donorski efekt supstrata odgovoran za niži afinitet prema molekuli vode kao šestom ligandu, jasno je da se navedena pojava ne može dobro ispitati molekulsko dinamičkim simulacijama budući da se parcijalni atomski naboji tijekom simulacija ne mijenjaju. Tijekom QM računa, naboj na  $\text{Fe}^{2+}$  bio je u odsustvu supstrata niži ( $0,707 e^+$ ) nego kada je supstrat bio vezan u aktivno mjesto,  $1,16 e^+$  (tablica 3.1.).



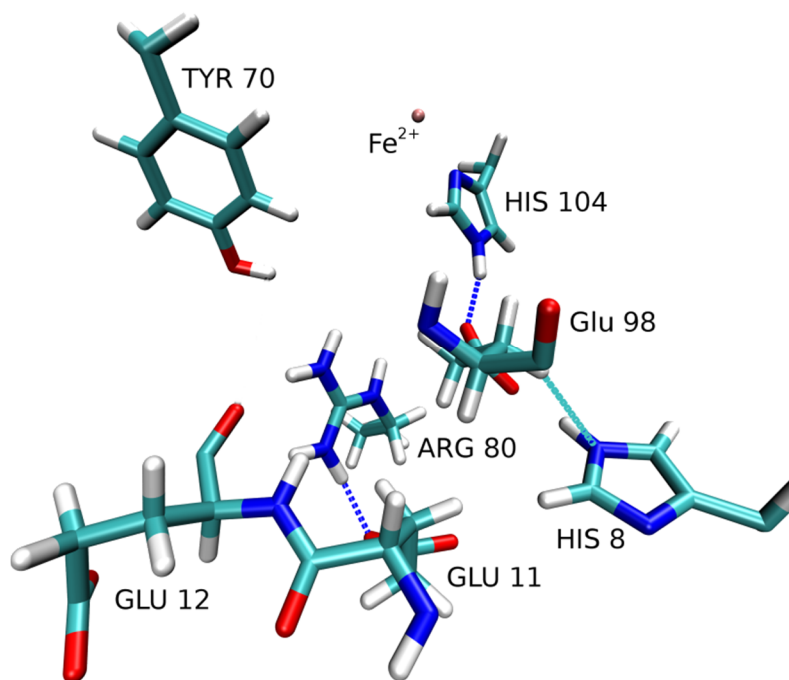
**Slika 3.8.<sup>e</sup>** Prva koordinacijska sfera WT-PD kompleksa utvrđena pomoću simulacija molekulske dinamike (ekstrahirana iz podjedinice A nakon 21 ns MD simulacija WT-PD kompleksa). WT-PD kompleks pokazuje oktaedarnu koordinaciju. Histidinski aminokiselinski ostatci koji koordiniraju metalni ion i supstrat prikazani su u štapićastoj reprezentaciji, dok je  $\text{Fe}^{2+}$  prikazan kao roza kuglica. Crnom isprekidanom linijom naznačena je koordinacija metala atomima koji se nalaze u 1. koordinacijskoj sferi.

Dok je vezno mjesto metalnog iona u nativnom sustavu u stanju mirovanja definirano s tri histidina i jednom karboksilatnom skupinom, u kompleksu je ono prvenstveno definirano s tri histidina uz vrlo mali udio koordinacije s tri histidina i jednim glutamatom (11%), a takav način koordinacije se pojavio samo u jednoj podjedinici, kada je vrijeme simulacije prešlo 22 ns).

U Dke1-PD kompleksu Glu98 biva izbačen iz prve koordinacijske sfere, nakon čega formira jaku vodikovu vezu s His104 (slika 3.9., tablica 3.3.), koja je prisutna tijekom 21 ns, od ukupno 40 ns, simulacija. Tijekom zadnjih 10 ns odnosno 20 ns simulacija vodikove veze između Glu98 i His104 te Arg80 i Glu98 prelaze u elektrostatske interakcije. Istovremeno interakcija između Tyr70 i Arg80 postaje slabija, a interakcija između Glu11 iz susjedne podjedinice i Arg80 jača (slika 3.9., tablica 3.3.). Za razliku od nativnog Dke1 bez vezanog supstrata u kome ta interakcija postoji paralelno s vodikovom vezom između navedenog Glu-a i His104 tijekom gotovo čitavog trajanja simulacije (tablica 3.3), u kompleksu ona ne egzistira dugo. Također tijekom simulacija kompleksa uspostavlja se elektrostatska interakcija

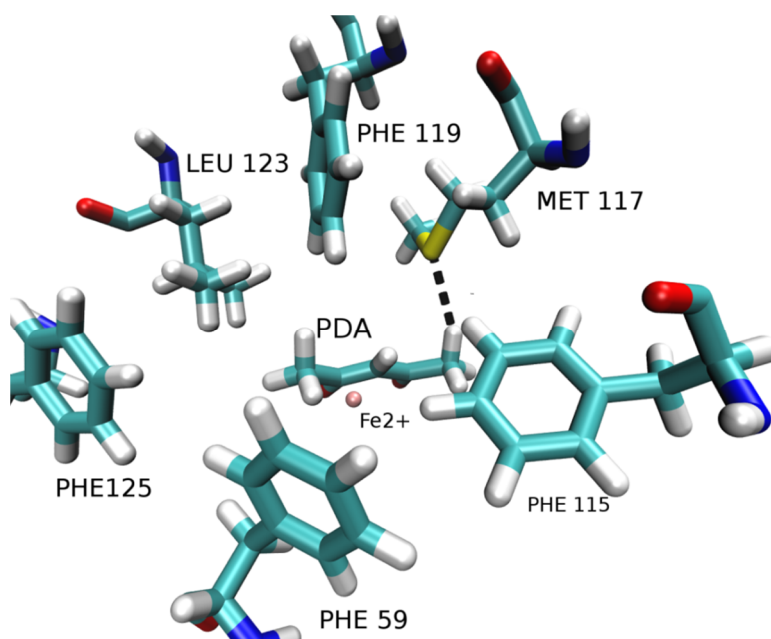
<sup>e</sup> Slika je ista kao i slika 1.3., ali je ponovno prikazana radi preglednosti

između Tyr70 i Glu12 iz susjedne podjedinice (slika 3.9.). Srednja udaljenost bočnih lanaca Tyr70 i Glu12 je 5,5 Å.

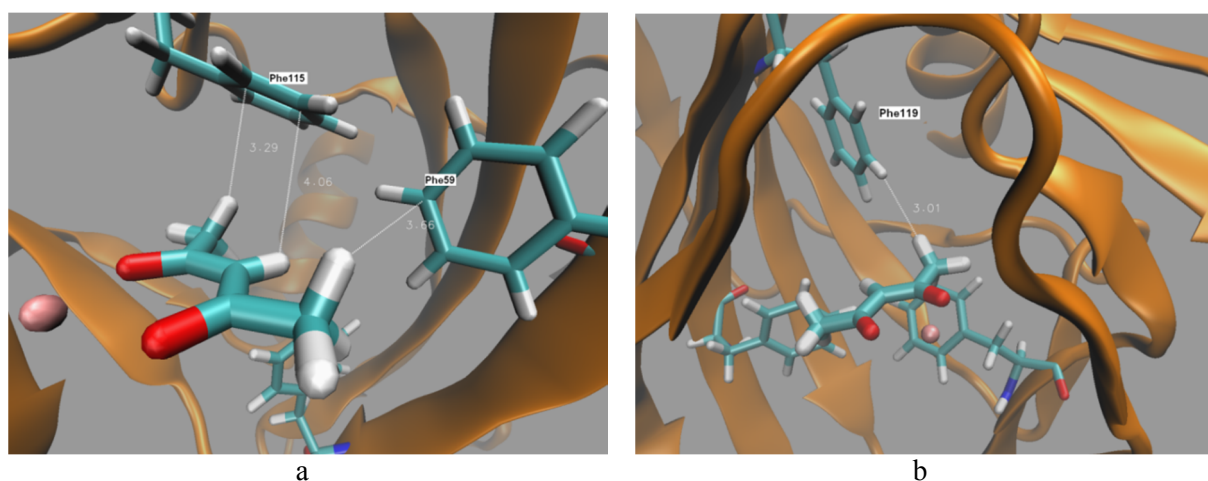


**Slika 3.9.** Orijentacija hidrofilne trijade Tyr70, Arg80 i Glu98 za koju se pretpostavlja da ima važnu ulogu u stabilizaciji prijelaznog stanja<sup>14</sup> WT-PD kompleksa. Plava isprekidana linija predstavlja jaku vodikovu vezu između His104 imidazola i karboksilne grupe Glu98, dok tirkizna isprekidana linija predstavlja elektrostatsku interakciju između karboksilne skupine Glu98 i imidazolnog prstena His8. Prikazana orijentacija je iz podjedinice A WT-PD kompleksa dobivenog nakon 21 ns MD simulacija. Napomena: His8, Glu11 i Glu12 su iz susjedne podjedinice

Phe59, Phe115, Phe 119, Phe125, Leu123, Met117 i Met77 sastavljaju predominantno hidrofobno vezno mjesto u kojemu je smješten supstrat (slika 3.10.). Supstrat interagira preko CH- $\pi$  elektrostatske interakcije s Phe59 (u obje orijentacije supstrata), a s Met117 preko H-S elektrostatske interakcije tijekom čitave MD simulacije. Phe115 je s Phe51 stabiliziran preko interakcije slaganja „licem u lice“ (*engl.* 'face-to-face stacking'), a preko „lice prema rubu“ sa Phe59. Met77 interagira s fenilnim prstenom Tyr70 preko CH- $\pi$  interakcija (pogledati sliku 3.11. za neke od ovih interakcija).



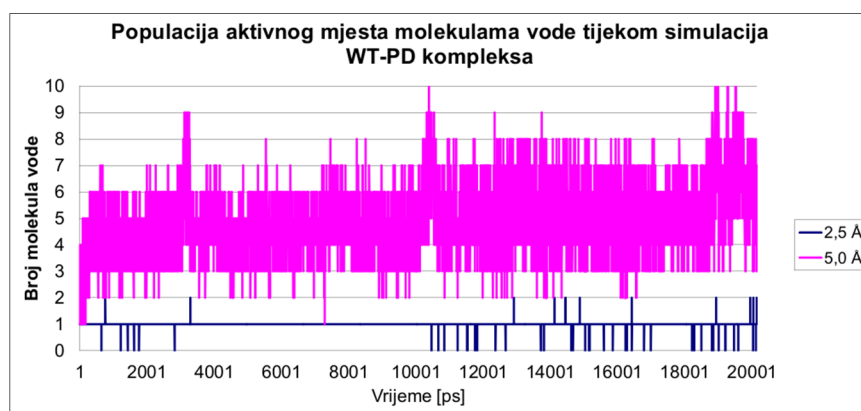
**Slika 3.10.** PD je u veznom mjestu stabiliziran preko elektrostatskih interakcija s  $\text{Fe}^{2+}$  ionom i s hidrofobnim kontaktima s okolnim aminokiselinskim ostacima. Supstrat interagira elektrostatski s atomom sumpora Met117 (udaljenost između vodika supstrata i sumpora Met117, prikazana crnom isprekidanom linijom, manja je od 3,5 Å).



**Slika 3.11.** Stabilizacija supstrata s hidrofobnim aminokiselinskim ostacima iz veznog mjesta Dke1. Prikazano je vezno mjesto u podjedinici A strukture Dke1 nakon 20 ns MD simulacija kompleksa Dke1-PD. Prikazane interakcije između fenilalanina i supstrata su prisutne tijekom čitave MD simulacije; srednja udaljenost (mjerena za podjedinicu A tijekom 40 ns MD simulacija, bijela linija) između najbližeg ugljikovog atoma Phe59 i PD je 4,0 Å (ugljikov atom PD je izabran zbog rotacije metilne grupe tijekom MD simulacija), srednja udaljenost između PD CH grupe i Phe115 fenila je 3,3 Å a između ugljikovog atoma metilne skupine PD i fenila Phe119 3,9 Å. Supstrat i aminokiselinski ostaci su prikazani u štapićastoj reprezentaciji, a  $\text{Fe}^{2+}$  ion je prikazan kao roza kuglica.

### 3.1.3.2. Kanali za molekule vode i zaposjednutost neposredne okolice $\text{Fe}^{2+}$ molekulama vode

Nakon uklapanja supstrata u aktivno mjesto, molekule vode se odmiču od iona željeza i napuštaju aktivno mjesto. Tijekom MD simulacija kompleksa, molekule vode koriste iste puteve, dakle kanale T1 i T2, da bi došle u aktivno mjesto (slika 3.6.) kao i tijekom simulacije enzima bez vezanog liganda, no učestalost korištenja kanala T2 je veća nego u slučaju simulacija samog proteina. Usporedbom strukture slobodnog proteina sa strukturom proteina u kompleksu sa supstratom, utvrđeno je da se tijekom simulacije potonjeg Arg80 reorijentira tako da njegov bočni lanac dolazi bliže ulazu u T2 kanal (dok je kod slobodnog proteina Arg80 bliže ulazu u T1 kanal). Blizina Arg80 povećava polarnost površine proteina u tom dijelu, što za posljedicu ima češće navođenje molekula vode za ulazak u T2 nego u T1 kanal za razliku od situacije kada je Arg80 blizu ulazu u T1 kanal. Da bi se približno ocijenila širina T1 i T2 kanala, izračunata je površina dostupna otapalu (*engl.* Solvent Accesible surface Area, SASA) za aminokiselinske ostatke koji definiraju ulaze u svaki od kanala na površini proteina te je utvrđeno da za T1 ona iznosi oko  $400 \text{ \AA}^2$  a za T2 oko  $300 \text{ \AA}^2$ . Srednje vrijednosti tijekom simulacija su (slobodni protein bez liganda, 50 ns MD)  $395 \pm 28 \text{ \AA}^2$  za T1, a za T2  $286 \pm 25 \text{ \AA}^2$  te za kompleks (40 ns MD-a)  $443 \pm 35 \text{ \AA}^2$  za T1, a za T2  $280 \pm 29 \text{ \AA}^2$ . Iz navedenog proizlazi kako za učestalog korištenja pojedinog kanala nije presudna širina njegovog ulaza na površini, već polarnost.



**Slika 3.12.** Broj molekula vode u prvoj (tamno plavo) i drugoj (ljubičasto) koordinacijskoj sferi željeznog iona tijekom prvih 20 ns MD simulacija WT-PD kompleksa (podaci za podjedinicu A).

Iako prisutnost supstrata (PD) koji bidentatno koordinira metalni ion rezultira smanjenjem broja molekula vode u prvoj koordinacijskoj sferi željeza (pogledati sliku 3.12. i



tablicu 1. u dodatku) njihov broj u drugoj koordinacijskoj sferi, odnosno u području do 3,5 Å od željeznog kationa uglavnom ostaje nepromijenjen. Tako je, npr. u periodima: 16.–21. ns i 36.–40. ns srednji broj molekula vode iznosio 1,9 (po svakoj podjedinici) za sustav sa slobodnim Dke1, a 1,8 za kompleks. U području do 5 Å od metalnog iona prosječan broj molekula vode u oba sustava iznosio je oko 3,7. Ravnotežna populacija molekulama vode u obje koordinacijske sfere metala uspostavljena je nakon pete nanosekunde u oba sustava.

### 3. 1. 3. 3. Fleksibilnost proteina

Vezanje supstrata značajno smanjuje fleksibilnost proteinske strukture te tako područja proteina koja su inače vrlo fleksibilna, kao npr. niz aminokiselinskih ostataka 80-87 (slika 3.13.a.), postaju krući. Navedeni aminokiselinski ostatci čine polaran, otapalu izložen okret na čijim se krajevima nalaze Arg80 i Ser88. Vezanjem supstrata uspostavlja se vodikova veza između okosnice Arg80 i Leu70 te na taj način cijeli okret 80-88 biva stabiliziran (crveno prikazano na slici 3.13.b.). Kod nativnog Dke1 u slučaju kad supstrat nije vezan ta udaljenosti iznosi prosječno 4,9 Å.

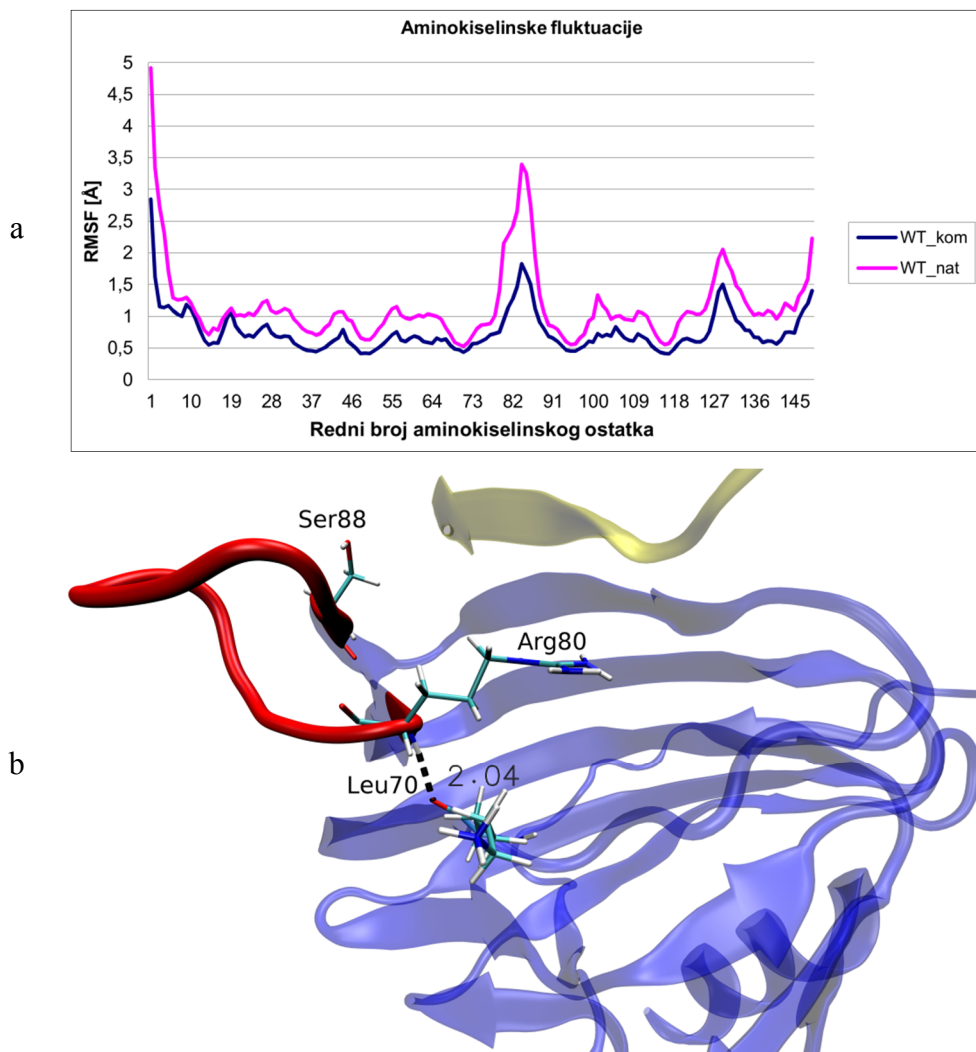
Ukratko, vezanje supstrata rezultira odmicanjem karboksilne skupine Glu98 od  $\text{Fe}^{2+}$  čime koordinacija metalnog iona s 3His i Glu prelazi u „3His“ koordinaciju. Također supstrat vezan u aktivno mjesto Dke1 učvršćuje strukturu enzima te ima utjecaj na učestalost korištenja pojedinih puteve kojima molekule vode dolaze do aktivnog mjesta.

### 3. 1. 4. Kompleksi mutanata Dke1 s PD

Da bi se razjasnila strukturna osnova za smanjenu redukciju molekule kisika u fenilalaninskim mutantima Dke1, provedene su simulacije kompleksa točkastih mutanata Dke1: Phe59Ala, Phe115Ala i Phe119Ala sa supstratom PD. Za svaki kompleks izvedeno je najmanje 60 ns simulacija, kao što je to navedeno u tablici 2.1.

Eksperimentalne analize brzine potrošnje kisika pokazale su da mutacije hidrofobnih aminokiselinskih ostataka (Phe->Ala) dovode do smanjenja redukcije  $\text{O}_2$  za red veličine. Prijašnje eksperimentalne studije upućuju na to da mutacija aminokiselinskog ostatka Glu98 rezultira smanjenjem redukcije  $\text{O}_2$  za dva reda veličine. Iz naših rezultata slijedi da razlog smanjene aktivnosti fenilalaninskih mutanata može biti promjena položaja Glu98. Pretpostavka je da vodikova veza između Glu98 i His104, gdje His104 donira  $\text{H}^+$  sa  $\text{N}_\epsilon$  na

Glu98 karboksilnu grupu, čini His104 više elektronegativnim, stabilizirajući tako oblik  $\text{Fe}^{3+}$ , za koji se pretpostavlja da je prijelazni oblik tijekom  $\text{O}_2$  redukcije [16].



**Slika 3.13.** a) Srednji RMSF (*engl.* Root Mean Square Fluctuation (kvadratni korijen usrednjenih kvadrata fluktuacija atoma koji definiraju okosnicu pojedinog aminokiselinskog ostatka) izračunat tijekom MD simulacija enzima bez (ljubičasta linija) i sa vezanim supstratom (tamnoplava linija).; b) Prikaz monomera Dke1, crveno je prikazan okret 80-88, žuto aminokiselinski ostatci iz susjedne podjedinice (kojoj pripada i Glu11), a plavo ostatak monomera, aminokiselinski ostatci na krajevima okreta (Arg80 i Ser88) kao i Leu70 koji vodikovom vezom s Arg80 stabilizira okret prikazani su u štapičastoj reprezentaciji

Pokazano je da postoji direktna korelacija između potrošnje kisika i aktivnosti enzima koje su za nativni Dke1 i njegove fenilalaninske mutante sumirane u tablici 6.2. u dodatku [12]. Katalitička aktivnost (efikasnost)  $k_{app}^{cat}{}_{PD}$ , je maksimalni broj molekula supstrata koje

enzim može prevesti u produkt po katalitičkom mjestu po jedinici vremena, što upućuje na brzinu reakcije.

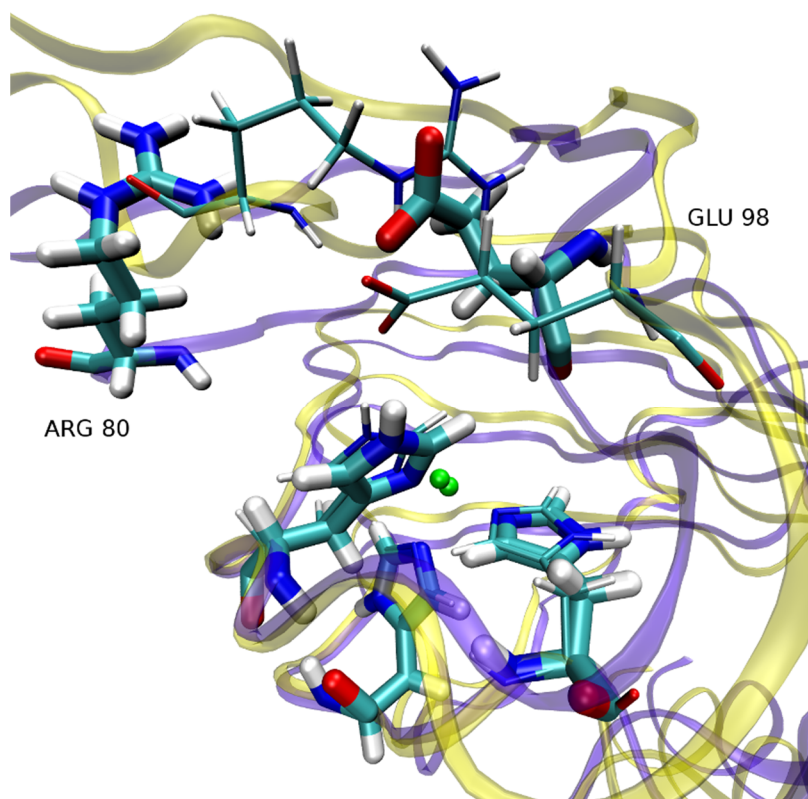
### 3. 1. 4. 1. Prva koordinacijska sfera i hidrofilna trijada u kompleksima s mutantima

Oktaedarna koordinacija željeznog kationa utvrđena u Dke1 kompleksu s PD očuvana je i u ovim sustavima. Analizom strukture proteina, tj. međusobnim odnosom aminokiselinskih ostataka važnih za stabilizaciju  $\text{Fe}^{2+}$  i proteinsku aktivnost otkriveno je da su položaji histidina His62, His64 i His104 dobro očuvani tijekom svih simulacija (sveukupno 60 ns: dvije nezavisne simulacije trajanja 20 i 40 ns). Suprotno tomu orijentacija Glu98 u kompleksima s mutiranim proteinima promijenjena je u odnosu na orijentaciju koju ima u kompleksu nativnog Dke1 s PD. U takvoj, promijenjenoj orijentaciji interakcija Glu98 s His104 znatno je oslabljena (tablica 3.3.). Jačina interakcije između Glu98 i Arg80 nije se bitno smanjila u kompleksima Phe59Ala i Phe115Ala varijanata, dok je kod Phe119Ala navedena vodikova veza tijekom MD simulacija prisutna dulje nego u kompleksu s nativnim proteinom. Zbog reorijentacije Glu98, vodikove veze između bočnog lanca Arg80 i karboksilne skupine Glu98 ( $\text{N}_\epsilon\text{--OE1/2}$  i  $\text{NH2--OE1/2}$ ) su poremećene tijekom početne etape MD simulacija kompleksa, ali postepena reorijentacija Arg80 rezultira njihovim ponovnim uspostavljanjem. U novom položaju bočni lanac Arg80 učinkovitije interagira s karboksilnom skupinom Glu11 iz susjedne podjedinice.

Najočitija promjena u položaju Arg80 pronađena je kod Phe115Ala mutanta, gdje je, u odnosu na položaj u prirodnom proteinu, pomaknut čitav okret sastavljen od aminokiselinskih ostataka 80-87 (slika 3.14.). U ovom kompleksu, položaj Arg80 je savršeno poravnat s ulazom u T1 kanal, čineći ga tako hidrofilnijim nego u drugim sustavima, što za posljedicu ima činjenicu da u kompleksu Phe115Ala-PD molekule vode češće nego u ostalim varijantima koriste kanal T1 za ulazak u aktivno mjesto enzima (tablica 3.4.).

Ulazak molekula vode [100] i točkaste mutacije mogu uzrokovati promjene u lokalnoj fleksibilnosti proteina. Analiza relativnih RMSF vrijednosti izračunatih za okosnicu proteina u različitim kompleksima tijekom zadnjih 20, od ukupno 40 ns MD simulacija otkriva da navedene točkaste mutacije povećavaju fleksibilnost proteina, posebno u područjima između aminokiselinskih ostataka 80 i 89 (slika 3.15.). Izuzetak je N-terminal (prvih 15 aminokiselinskih ostataka), koji je u Phe59Ala i Phe119Ala mutantima tijekom simulacija

njihovih kompleksa s PD manje odstupao od srednjeg položaja nego u kompleksima s nativnim proteinom.

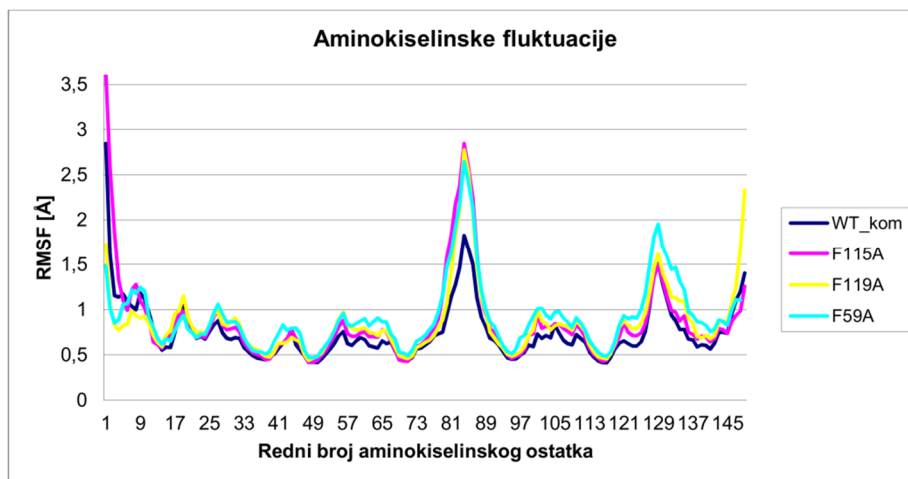


**Slika 3.14.** Pomak okreta definiranog aminokiselinskim slijedom 80-88 u Phe115Ala-PD kompleksu (ljubičasta vrpca) u odnosu prema položaju u kompleksu s nativnim proteinom (žuta vrpca). Prikazane su strukture podjedinica A nakon 20 ns MD simulacija. Ključni aminokiselinski ostatci su prikazani u štapičastoj reprezentaciji, pri čemu tanji pripadaju nativnom proteinu. Metalni ion prikazan je zelenom kuglicom.

**Tablica 3.4.** Prometovanje molekula vode iz okolnog otapala do aktivnog mjesta enzima tijekom MD simulacija kompleksa. Prikazan je postotak korištenja pojedinog tunela (T1 ili T2 prikazani na slici 3.6) dobiven analizom prometovanja molekula vode tijekom dva različita perioda (15.-20. ns i 35.-40. ns) MD simulacija koje su trajale 40 ns.

| Ulazak molekula vode tijekom MD (%) |      |          |           |           |
|-------------------------------------|------|----------|-----------|-----------|
| tunel                               | Dke1 | Phe59Ala | Phe115Ala | Phe119Ala |
| <b>T1</b>                           | 63   | 61       | 84        | 61        |
| <b>T2</b>                           | 37   | 39       | 16        | 29        |

Ukratko, navedene Phe u Ala mutacije rezultiraju slabljenjem Glu98-His104 interakcije i povećanjem pokretljivosti većeg dijela proteina. Analiza učestalosti prolaska molekula vode kroz kanale T1 i T2 otkrila je njihovu ovisnost o orijentaciji polarnih aminokiselinskih ostataka, kao što je Arg80, na ulazima u kanale.



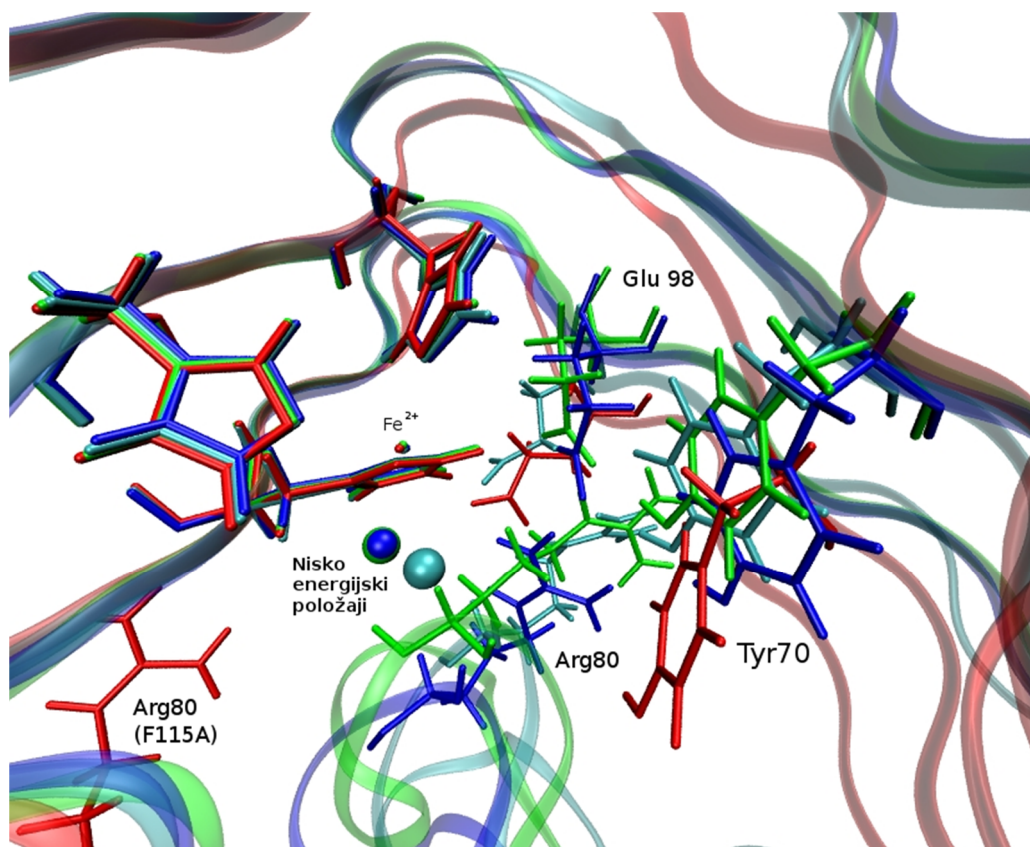
**Slika 3.15.** Srednji RMSF (korijen srednjih kvadratnih fluktuacija) izračunat za enzim (WT i mutante) u kompleksu sa PD. RMSF je izračunat tijekom posljednjih 20 od ukupno 40 ns MD simulacija i usrednjen po svim podjedinicama.

Analiza strukture promatranih varijanata kako eksperimentalna, tako i teorijska, upućuju na to da točkaste mutacije hidrofobnih aminokiselinskih ostataka koji okružuju vezno mjesto supstrata ne utječu na stabilizaciju metalnog iona i nemaju prevelik utjecaj na njegovu sekundarnu strukturu i na smatanje proteina. No, MD simulacije su otkrile da mutacije dovode do povećanja lokalne fleksibilnosti proteina kod mutanata, posebno najpokretljivijeg područja, tj. niza aminokiselinskih ostataka 80-88 (slika 3.13.a), čiji je član i Arg80. Arg80 interagira s Glu98 i Tyr70, aminokiselinskim ostacima iz veznog mjesta te usmjerava molekule vode u tunele T1 ili T2 koji vode do metalnog iona.

#### 3. 1. 4. 2. Rezultati GRID računa

Da bi se istražio navodni utjecaj mutacija na stabilizaciju O<sub>2</sub> molekule u aktivnom mjestu, izvedeni su računi programom GRID [71]. Korištena je sfera radijusa 3,1 Å sa središtem na Fe<sup>2+</sup> kako bi se utvrdili mogući minimumi za položaj O<sub>2</sub> molekule. Rezultati (tablica 3.5.) upućuju na sličnost afiniteta molekule kisika za vezanje u aktivno mjesto Phe59Ala i Phe119Ala mutanata s afinitetom vezanja u aktivno mjesto nativnog proteina. No,

kako je prikazano na slici 3.16., mjesta najvišeg afiniteta za O<sub>2</sub> u mutantima su pomaknuta s obzirom na njegov položaj kod nativnog enzima. Također je važno primijetiti da kod mutanta Phe115Ala položaj visokog afiniteta prema O<sub>2</sub> molekuli više ne postoji u veznom mjestu. Za taj je mutant izmjerena najniža katalitička aktivnost.



**Slika 3.16.** Niskoenergijski položaji za molekulu O<sub>2</sub> na udaljenosti do 3,1 Å od Fe<sup>2+</sup>, kako je utvrđeno programom GRID te dano u tablici 3.5. Aminokiselinski ostatci su prikazani štapićima, O<sub>2</sub>, velikim, a Fe<sup>2+</sup> malim kuglicama. Strukture, Fe<sup>2+</sup> i niskoenergijski položaji za O<sub>2</sub> predstavljeni su u svijetloplavoj boji za WT Dke1, tamnoplavi za Phe59Ala i zeleno za Phe119Ala. Može se primijetiti da se niskoenergijski položaji za Phe59Ala i Pha119Ala preklapaju. Za molekulu kisika u aktivnom mjestu Pha115Ala nije nađen položaj čija bi energija zadovoljavala postavljene uvijete.

**Tablica 3.5.** Niskoenergijski položaji ( $E < -5$  kcal/mol<sup>f</sup>) za O<sub>2</sub> molekulu u aktivnom mjestu, unutar 3,1 Å od Fe<sup>2+</sup>, utvrđeni pomoću programa GRID.

| WT                  |                                      | Phe59Ala            |                                       | Phe115Ala           |                                       | Phe119Ala           |                                       |
|---------------------|--------------------------------------|---------------------|---------------------------------------|---------------------|---------------------------------------|---------------------|---------------------------------------|
| Energija [kcal/mol] | Udaljenost(od Fe <sup>2+</sup> ) [Å] | Energija [kcal/mol] | Udaljenost (od Fe <sup>2+</sup> ) [Å] | Energija [kcal/mol] | Udaljenost (od Fe <sup>2+</sup> ) [Å] | Energija [kcal/mol] | Udaljenost (od Fe <sup>2+</sup> ) [Å] |
| -5,8                | 3,0                                  | -7,1                | 2,0                                   | -                   | -                                     | -5,7                | 2,6                                   |
| -5,2                | 3,0                                  | -6,7                | 2,7                                   | -                   | -                                     | -6,7                | 2,6                                   |
| -6,7                | 3,0                                  | -5,9                | 2,0                                   | -                   | -                                     | -8,1                | 2,2                                   |
| -6,5                | 2,3                                  | -6,7                | 3,0                                   | -                   | -                                     | -6,3                | 2,1                                   |
| -6,3                | 2,7                                  | -                   | -                                     | -                   | -                                     | -                   | -                                     |
| -6,3                | 2,9                                  | -                   | -                                     | -                   | -                                     | -                   | -                                     |

### 3. 1. 4. 3. Izbacivanje liganda iz aktivnog mjesta enzima

Da bi utvrdili kako mutacije utječu na vezanje supstrata (PD), napravljen je niz RAMD simulacija tijekom kojih je praćen izlazak supstrata iz veznog mjesta. Pretpostavili smo da te iste puteve supstrat koristi za dolazak do aktivnog mjesta. Za svaki kompleks napravljeno je 15 RAMD simulacija te je utvrđeno da u WT sustavu supstrat najčešće koristi tunel T1 (isti tunel za koji je utvrđeno da molekule vode koriste za dolazak do aktivnog mjesta), a u drugim sustavima supstrat vrlo često koristi i druge puteve (tablica 3.6.).

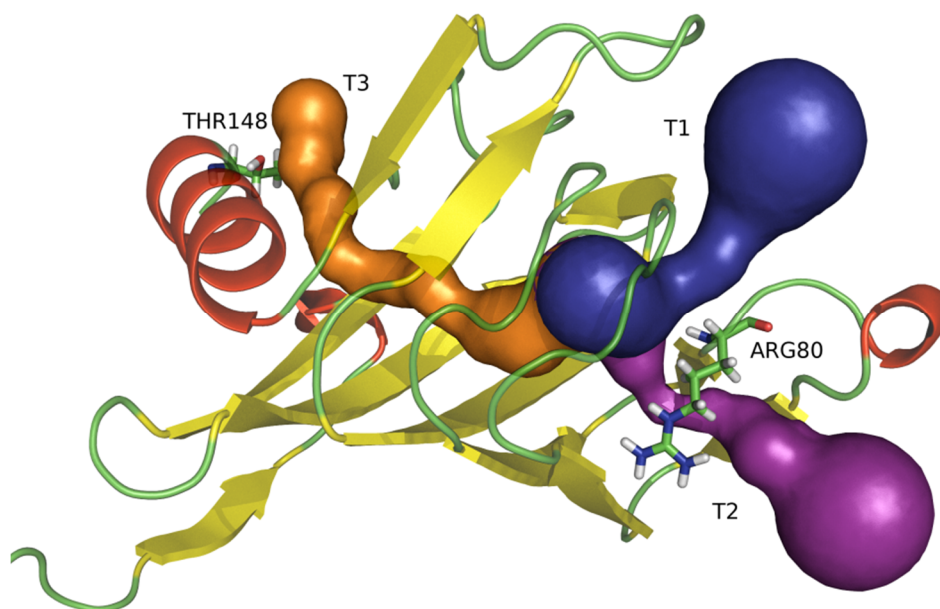
**Tablica 3.6.** Prikazani su rezultati RAMD simulacija za supstrat i produkte u kompleksima (s prirodnom Dke1 i mutantima). U prve četiri kolone dani su putevi izbacivanja supstrata u kompleksima s nativnim proteinom i mutantima, a u zadnje dvije kolone su dani putevi izlaska produkata iz kompleksa s nativnim Dke1. Svaka simulacije je ponovljena 20 puta, a u tablici se nalazi postotak korištenja svakog tunela bilo od strane supstrata, ili molekula produkata.

| Kompleks<br>Tunel           | WT-PD | Phe59Ala - PD | Phe115Ala – PD | Phe119Ala - PD | WT-MG | WT-AC |
|-----------------------------|-------|---------------|----------------|----------------|-------|-------|
| Postotak (%) odabira kanala |       |               |                |                |       |       |
| T1                          | 40    | 20            | 10             | 20             | 0     | 15    |
| T2                          | 15    | 0             | 5              | 15             | 0     | 0     |
| T3                          | 40    | 65            | 85             | 60             | 100   | 77    |
| Ostali                      | 5     | 15            | 0              | 5              | 0     | 8     |
| Najčešći                    | T1/T3 | T3            | T3             | T3             | T3    | T3    |

<sup>f</sup> -5 kcal/mol je bila granična energija za prihvatanje O<sub>2</sub> položaja



Zanimljivo je da u Phe115Ala mutantu supstrat najčešće koristi hidrofobni tunel T3 (slika 3.17.), kojim molekule vode rijetko prometuju. Ovaj tunel se proteže od veznog mjesta gdje je koordiniran aminokiselinskim ostacima Phe51, Phe59, Phe115 i Phe125 do površine enzima gdje završava u blizini Ala27 i Thr148. Na svom unutarnjem kraju, pred ulazak u aktivno mjesto, tunel je širi kod Phe59Ala i Phe115Ala mutanata, nego u prirodnom nemutiranom proteinu. Posljedica toga je veća učestalost korištenja tog tunela za transport supstrata u mutiranim nego u prirodnom proteinu. Tijekom simulacija sustava s nativnim enzimom, supstrat je tunel T3 koristio u 40% slučajeva dok je kod mutanta Phe59Ala i Phe115Ala u 65%, odnosno 85% slučajeva supstrat iz aktivnog mjesta izašao kroz tunel T3. Osim toga navedeni tunel je glavna ruta za izbacivanje produkata katalitičke reakcije (metilglikoksala i acetata) iz enzima te je za očekivati je da će njihova izmjena sa supstratom kod mutanta biti ometena u odnosu na prirodni nemutirani protein.



**Slika 3.17.** Tuneli za ulaz/izlaz molekula vode i supstrata utvrđeni tijekom MD i RAMD simulacija. Površine tunela, određene kao površine kuglica najvećeg mogućeg radijusa koje se mogu smjestiti u pojedinim točkama utvrđenih puteva, prikazane su različitim bojama: tamno plavo T1; purpurnoljubičasto T2 i narančasto T3. Može se primijetiti da molekule vode i supstrat koriste iste puteve za prolazak kroz protein. Slika je pripremljena pomoću izlaznih datoteka programa Caver [69] i PyMol-a [70] (program za vizualizaciju molekulskih struktura). Tuneli su prikazani u podjedinici A Dke1-PD kompleksa. Topologija tunela je identična u svim varijantima.



### 3. 1. 5. Simulacije sa hidrofilnim mutantima

Da bi se pojasnio eksperimentalno utvrđen dvofazni način vezanja  $\text{Fe}^{2+}$  u aktivno mjesto, uz već izvedene račune na nativnom proteinu i njegovom kompleksu s PD, simulirani su sustavi s varijantima u kojim su hidrofilni aminokiselinski ostatci, članovi tzv. katalitičke trijade mutani u alanin odnosno glutamin: Tyr70Ala, Arg80Ala i Glu98Gln. Primijenjeno je nekoliko različitih pristupa [101]: MD simulacije *apo* enzima (bez prisutnog  $\text{Fe}^{2+}$ ), MD simulacije s  $\text{Fe}^{2+}$  vezanim u aktivno mjesto, simulacije izbacivanja željeza iz veznog mjesta s i bez primjene nasumične sile te simulacije s neograničenim gibanjem metala u proteinu. Posljednje se odnosi na simulacije u kojima je ion metala opisan isključivo neveznim parametrima, a njegov početni položaj je bio ili u aktivnom mjestu ili u „vodenom tunelu“.

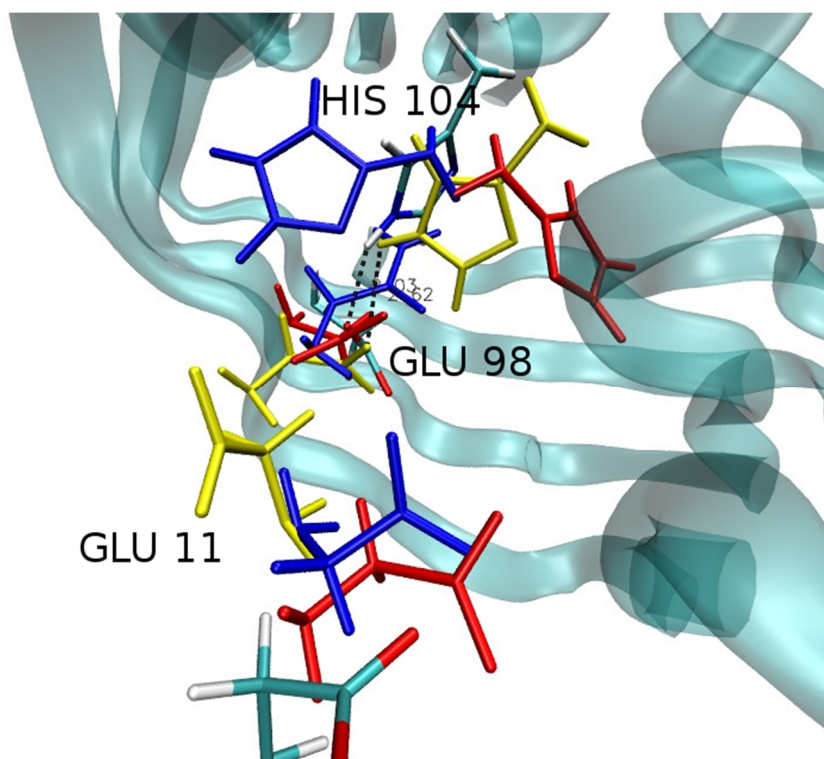
#### 3.1.5.1. MD simulacije s *apo* enzimima

Kao što je navedeno u tablici 2.1. izvedeno je 6 ns MD simulacija nativnog Dke1 i varijanata Glu98Gln, Arg80Ala i Tyr70Ala bez metala prisutnog u enzimu. Analize dobivenih trajektorija pokazale su da je aminokiselinski ostatak Glu98 bio vezan vodikovom vezom za His104 tijekom više od 50% vremena trajanja simulacija nativnog proteina i Tyr70Ala mutanta, dok tijekom MD simulacija preostala dva mutanta nije došlo do nastanka ove veze, a za aminokiselinske ostatke Glu98 i His104 izmjerene su znatno više fluktuacije nego u prethodna dva varijanta (tablica 6.3. u dodatku). Glu11 iz susjedne podjedinice, za koji je pokazano da ima važnu ulogu pri stabilizaciji aminokiselina koje koordiniraju metal, u *apo* enzimima nema vezu s histidinima koji vežu metal te je orijentiran na suprotnu stranu u svim varijantima. Na slici 3.18. prikazani su preklopljeni dijelovi optimiziranih struktura dobivenih nakon 6 ns MD simulacija.

#### 3.1.5.2. MD simulacije s $\text{Fe}^{2+}$ vezanim u aktivno mjesto

Tijekom MD simulacija s  $\text{Fe}^{2+}$  vezanim u aktivno mjesto osim histidinskih aminokiselinskih ostataka, koji prema kristalografskim rezultatima koordiniraju  $\text{Fe}^{2+}$ , u koordinaciji metalnog iona sudjelovao je i Glu98. Uobičajena orijentacija Glu98 prikazana je na slici 3.19.a. Tijekom monodentatnog vezanja za  $\text{Fe}^{2+}$  drugi karboksilni kisik Glu98 je vezan vodikovom vezom za Arg80 u nativnom proteinu [12] i Tyr70Ala mutantu (60% odnosno 90% vremena simulacija, tablica 3.7.). Vezanje Glu98 i Arg80 dovodi do reorijentacije Glu11 i nastajanja stabilne vodikove veze između Glu11 i His104 u nativnom

proteinu (tijekom 84% vremena, tablica 3.7.). U Arg80Ala mutantu također je utvrđena interakcija između Glu11 i His104 (tijekom cijelog vremena simulacija koje su trajale 6 ns), kao što je prikazano na slici 3.19.a.

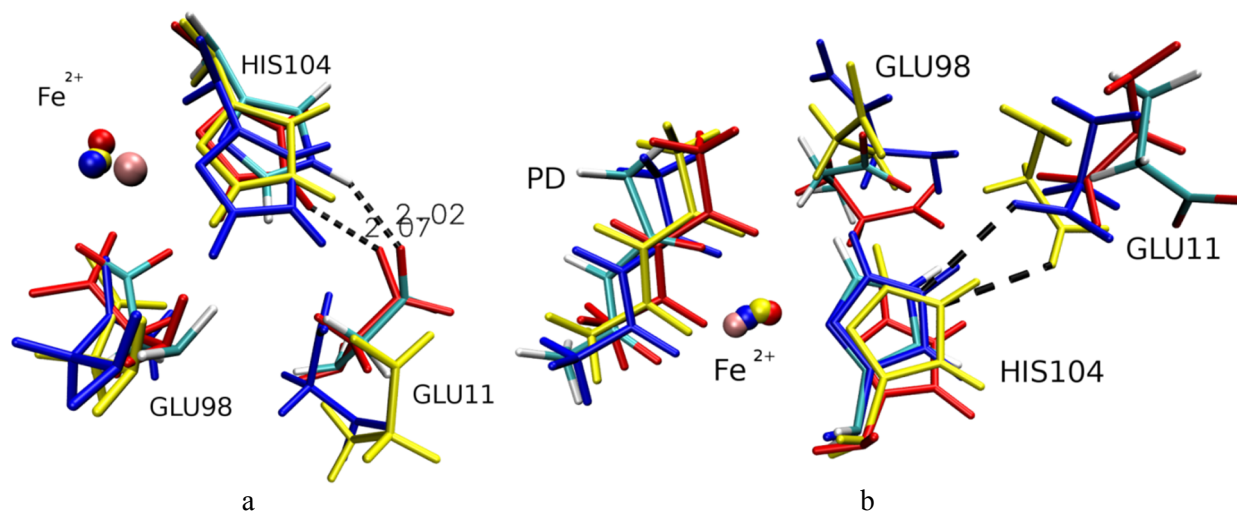


**Slika 3.18.** Orijentacija Glu11 (iz susjedne podjedinice) i Glu98 u sustavima bez vezanog metala; u nativnom proteinu i mutantu Tyr70Ala Glu98 je vezan za His104 (prikazano crnim isprekidanim linijama) dok je u ostalim mutacijama „slobodan“ što mu omogućuje bržu reorijentaciju. His104, Glu98 i Glu11 prikazani su u štapićastoj reprezentaciji tako da je svaki varijant obojan drugačije: nativni protein prema imenima atoma, Tyr70Ala žuto, Arg80Ala crveno i Glu98Gln plavo. Prikazani su dijelovi optimizirane strukture podjedinice A dobivene nakon 6 ns MD simulacija tetramera.

### 3.1.5.3. Simulacije na sustavima s vezanim PD

Vezanje supstrata u aktivno mjesto inducira izbacivanje Glu98 iz koordinacijske sfere metala u svim varijantima. U aktivnom mjestu supstrat koordinira metalni ion bidentatno, dok se Glu98 reorijentira održavajući pri tome svoje interakcije s Arg80 u nativnom proteinu, s N<sub>ε</sub> (34% vremena simulacije) ili sa NH<sub>2</sub> (20%) i u Tyr70Ala mutantu (N<sub>ε</sub> (37%), s NH<sub>2</sub> (59%)). Interakcija između Glu98 i Arg80 u mutantima Glu98Gln i Arg80Ala ne postoji, što je uzrokovano mutacijama istih aminokiselinskih ostataka. U Glu98Gln i Tyr70Ala mutantima Arg80 interagira s CD2 His104 tijekom 28% odnosno 26% vremena

simulacije, dok u ostalim simuliranim sustavima ova interakcija ne postoji. Interakcija između Glu98 i His104 najjača je u Arg80Ala mutantu, a nakon toga u nativnom enzimu, kao što je navedeno u tablici 3.7.



**Slika 3.19.** Orijentacija aminokiselinskih ostataka Glu98, Glu11 (iz susjedne podjedinice) i His104 u proteinima s metalnim ionom vezanim u aktivnom mjestu a) bez vezanog supstrata, b) sa vezanim supstratom. Crna isprekidana linija prikazuje vodikove veze koje se javljaju među navedenim aminokiselinama koje su prikazane u štapićastoj reprezentaciji tako da je svaki varijant obojan drugačije: nativni protein prema imenima atoma, Tyr70Ala žuto, Arg80Ala crveno i Glu98Gln plavo.

#### 3.1.5.4. Odlazak $\text{Fe}^{2+}$ iz aktivnog mjesta

U ovim simulacijama željezo (za koje su korišteni samo nevezni parametri) je na početku simulacija postavljeno u aktivno mjesto enzima. Budući da se metalni ion mogao slobodno gibati tijekom simulacija, on je u pojedinim slučajevima napustio aktivno mjesto te ili izišao iz proteina ili se smjestio u drugom dijelu proteina. Simulacije su izvedene na dva različita načina, najprije bez primjene dodatne sile na metalni ion te nakon toga uz primjenu sile u nasumičnom smjeru.

**Tablica 3.7.** Analiza vodikovih veza za nativni (WT) enzim i točkaste mutante hidrofilnih aminokiselinskih ostataka. U tablici je dan postotak vremena zastupljenosti pojedinih veza tijekom MD simulacija. Nastavak „kom” označava kompleks, „slo” slobodni protein bez vezanog PD, a „T” označava sustav sa Fe<sup>2+</sup> koji je na početku simulacija postavljen u „vodeni tunel”. Oznaka X znači da navedena vodikova veza nije pronađena tijekom MD simulacija (odnosno da je njezina zastupljenost manja od 2% ukupnog vremena simulacija). Karakteristične veze prikazane su na slici 6.1. u dodatku.

|               |               | E98Q<br>- kom | E98Q<br>- slo | E98Q<br>- T | Y70A<br>- kom | Y70A<br>- slo | Y70A<br>- T | R80A<br>- kom | R80A<br>- slo | R80A<br>- T | WT <sup>g</sup><br>- kom | WT <sup>f</sup><br>- slo | WT<br>- T |
|---------------|---------------|---------------|---------------|-------------|---------------|---------------|-------------|---------------|---------------|-------------|--------------------------|--------------------------|-----------|
| Gly68 (O)     | Glu98 (N)     | 99,9          | 99,5          | 99,9        | 74,6          | 75,0          | X           | 99,5          | 99,9          | 99,9        | 74                       | 100                      | X         |
| Gly68 (O)     | Glu98 (CG)    | 63,5          | X             | 13,9        | 2,9           | 13,0          | X           | X             | X             | X           | X                        | 5                        | X         |
| Glu11 (OE12)  | Hie104 (NE2)  | 43,5          | X             | 4,9         | 24,4          | X             | X           | X             | 100           | 23,5        | 3                        | 84                       | 11,1      |
| Arg80 (NE)    | Glu98 (OE1/2) | X             | X             | 6,4         | 36,9          | 15,3          | 69,9        | X             | X             | X           | 34                       | 63                       | 21,3      |
| Arg80 (NH2)   | Glu98 (OE1/2) | X             | X             | 25,0        | 58,8          | 92,5          | 81,0        | X             | X             | X           | 20                       | 64                       | 61,4      |
| Glu98 HB(2,3) | Glu11 (OE1/2) | 100           | X             | 63,8        | X             | X             | X           | X             | X             | 17,4        | 3,6                      | 7,2                      | X         |
| Glu98 (OE12)  | Hie104 (NE2)  | 14,2          | 61,5          | 10,2        | 27,2          | X             | 36          | 68,8          | X             | 2,6         | 49,4                     | X                        | 27,9      |

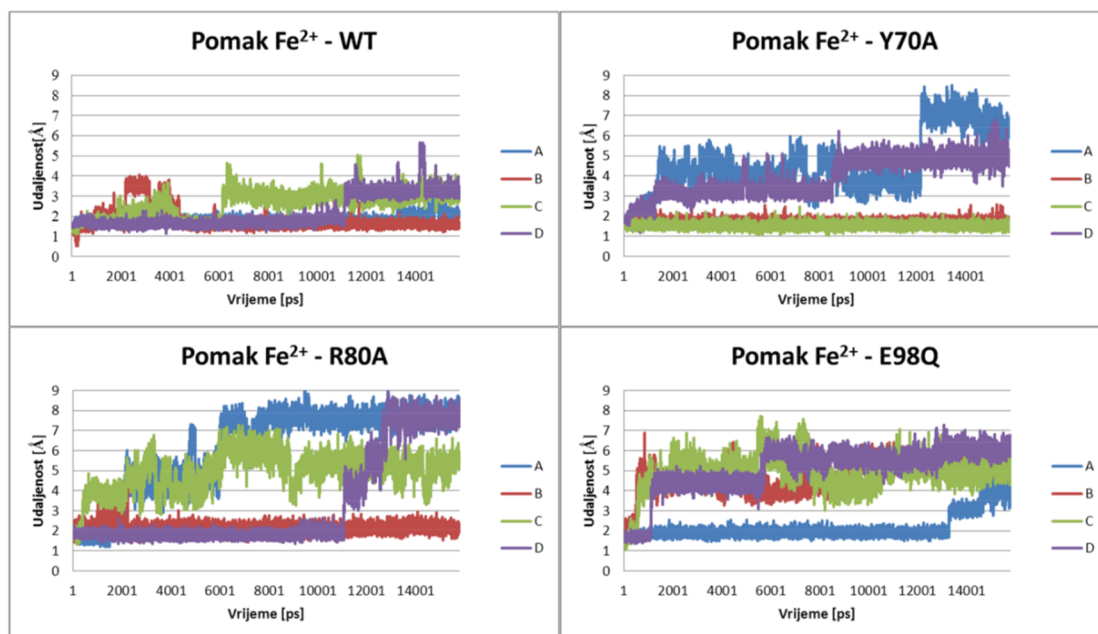
<sup>g</sup> Podaci se već nalaze u tablici 3.3.

### 3.1.5.4.1. Odlazak $\text{Fe}^{2+}$ iz aktivnog mjesta – bez primjene dodatne sile

Tijekom simulacija na sobnoj temperaturi, kod kojih je  $\text{Fe}^{2+}$  bio opisan samo s nabojem ( $1,5 e^+$ ) i van der Waalsovom radijusom, zamijećeno je odmičanje  $\text{Fe}^{2+}$  od početnog položaja u svim varijantima. Tako je na kraju 5. nanosekunde simulacija kod Arg80Ala i Glu98Gln varijanata oko dvije trećine veznih mjesta već bilo upražnjeno, kao što je prikazano u tablici 3.8.

**Tablica 3.8.** Postotak vremena (prosjeak svih podjedinica) koje je  $\text{Fe}^{2+}$  tijekom MD simulacija proveo u aktivnom mjestu. Podaci za sustav s nativnim (WT) enzimom i njegovim mutantima.

| Vrijeme<br>simulacije [ns] | Fe <sup>2+</sup> u aktivnom mjestu (%) |          |          |          |
|----------------------------|--|----------|----------|----------|
|                            | WT                                     | Arg80Ala | Glu98Gln | Tyr70Ala |
| prvih 5                    | 100                                    | 36,9     | 33,9     | 55,8     |
| 46                         | 34,8                                   | 9,1      | 16,9     | 28,3     |



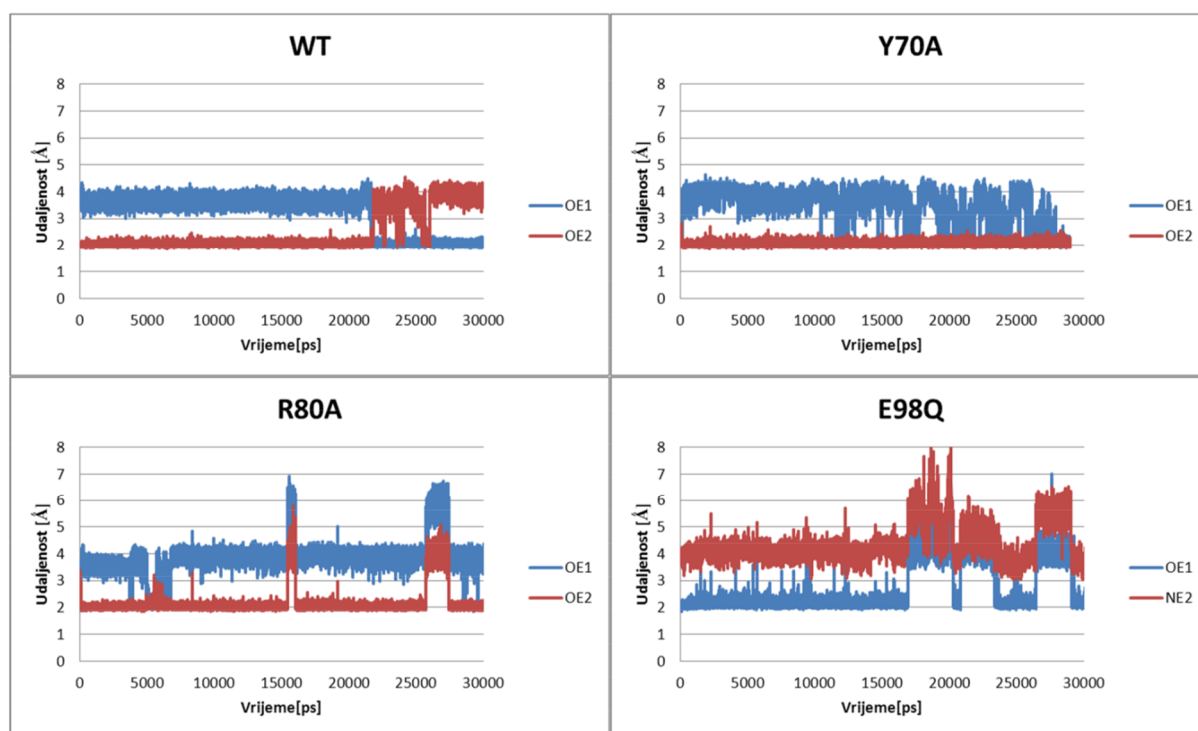
**Slika 3.20.** Udaljenost metalnih iona od inicijalnih položaja u četiri podjedinice tijekom početnih 16 ns MD simulacija na sobnoj temperaturi.

Analiza trajektorije dobivenih simulacijama nativnog enzima i Tyr70Ala mutanta tijekom 46 ns upućuje na to da je u prosjeku 30-35% vremena simulacija  $\text{Fe}^{2+}$  proveo u

aktivnom mjestu (usrednjeno preko svih podjedinica). No, otpor metalnog iona prema napuštanju početnog položaja u kome je koordiniran s His62, His64 i His104 značajno je niži kod Arg80Ala i Glu98Gln mutanata (tablica 3.8.).

Migracija metalnog iona može se pratiti na slici 3.20. gdje je dan pomak metalnog iona od početnog položaja u kome je koordiniran s 3 His i jednim Glu. Dok u Arg80Ala mutantu metalni ioni vrlo brzo napuštaju vezno mjesto, u nativnom proteinu putuju od aktivnog mjesta i natrag, ali se rijetko pomiču više od 3,5 Å od svojih početnih položaja (slika 3.20.)

Kako bi pojasnili mehanizam odlaska  $\text{Fe}^{2+}$  iz aktivnog mjesta pored koordinacije metala analizirane su i His104-Glu98-Arg80 interakcije (slika 3.21. i slika 5.2. u dodatku). Tijekom simulacija Glu98 (u slučaju mutacije Glu98Gln, Gln) koordinira metalni ion monodentatno ili bidentatno. Odnos bi/monodentatne koordinacije najviši je u Arg80Ala mutantu, a slijedi ga Tyr70Ala (tablica 6.4. u dodatku).

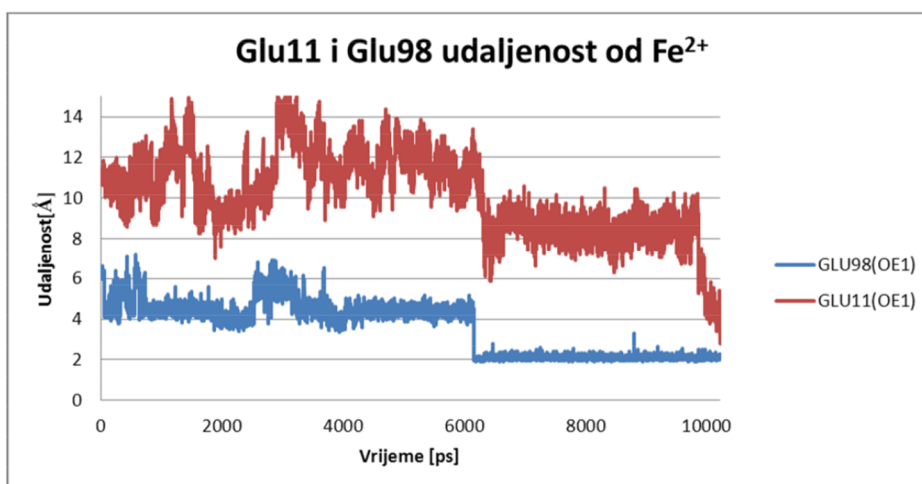


**Slika 3.21.** Grafovi prikazuju Glu/Gln98 –  $\text{Fe}^{2+}$  udaljenost u najreprezentativnijoj podjedinici (D) tijekom prvih 30 ns MD simulacija na sobnoj temperaturi

U nativnom proteinu Glu98 većinu vremena monodentatno koordinira metalni ion, u položaju kada je ovaj koordiniran s tri histidina (metal u veznom mjestu), dok drugi kisik

njegove karboksilne skupine interagira preko vodikove veze s Arg80. Migracija metala iz aktivnog mjesta popraćena je s razdvajanjem Arg80 i Glu98. Zbog udaljavanja bočnog lanca Arg80 u smjeru suprotnom od aktivnog mjesta, vodikova veza između Arg80 i Glu98 puca. Rezultat je povećana mobilnost Glu98 koji se odmiče od svog početnog položaja i pri tome povlači metalni ion za sobom te ga udaljuje od aktivnog mjesta (zelena i ljubičasta linija na slici 5.2. u dodatku na grafovima prikazanim za sustav s nativnim enzimom).

Istovremeno, tijekom MD simulacija dolazi do reorijentacije Glu11 u smjeru metalnog iona. Rezultat je koordinacija metalnog kofaktora s Glu11 i Glu98. Takav oblik koordinacije nije stabilan (ne traje dugo), no kako je vrlo čest, pretpostavljamo da ima važnu ulogu u transportu metalnog iona u i izvan proteina (slika 3.22.)



**Slika 3.22.** Paralelan prikaz udaljenosti između Glu98(OE1) –  $\text{Fe}^{2+}$  i Glu11(OE1) –  $\text{Fe}^{2+}$ ; ova slika ide u prilog teoriji da su oba glutamata važna pri transportu  $\text{Fe}^{2+}$  do aktivnog mjesta i natrag. Slika je dobivena analizom A podjedinice tijekom simulacija sustava s nativnim proteinom.

U odsustvu Arg80 koji stabilizira Glu98, Arg80Ala mutant, Glu98 gotovo trenutno odvlači  $\text{Fe}^{2+}$  iz aktivnog mjesta (tablica 3.8.). Glu98 ostaje monodentatno ili bidentatno koordiniran za  $\text{Fe}^{2+}$  ili uspostavlja vodikovu vezu s His104 (slika 5.2. u dodatku). U Glu98Gln mutantu ne postoji vodikova veza između Gln98 i His104 ili Arg80 dok je željezo u aktivnom mjestu. No, kada željezo napusti aktivno mjesto Gln98 se veže vodikovom vezom za His104 (slika 5.2. u dodatku i slika 3.20. npr. podjedinica D).

Rezultati dugih MD simulacija (46 ns) Dke1 varijanata, u kojima je  $\text{Fe}^{2+}$  opisan samo neveznim parametarima, (tablica 2.1.) mogu se korelirati sa stopom gubitka  $\text{Fe}^{2+}$  određenom

eksperimentalno (u tablici 6.5. u dodatku). Najbrži gubitak  $\text{Fe}^{2+}$  utvrđen je za Arg80Ala mutant, što odgovara najkraćoj prisutnosti metalnog iona u aktivnom mjestu tijekom MD simulacija.

#### 3.1.5.4.2. Odlazak $\text{Fe}^{2+}$ iz aktivnog mjesta potaknut primjenom male nasumčne sile

U drugom pristupu simulirali smo izbacivanje  $\text{Fe}^{2+}$  iz aktivnog mjesta uz pomoć primjene sile nasumičnog smjera. Uz prisutnost sile do pomicanja željeza iz aktivnog mjesta došlo je na znatno kraćoj vremenskoj skali nego u „običnim“ MD simulacijama (poglavlje 3.1.5.4.2.). Umjesto jedne izveli smo nekoliko simulacija uz jednak utrošak računalnih resursa, čiji je rezultat statistička raspodjela putanja kojima  $\text{Fe}^{2+}$  izlazi iz aktivnog mjesta.  $\text{Fe}^{2+}$  je praćen tijekom 250 ps, a konačni položaji iona sumirani su u tablici 3.9.

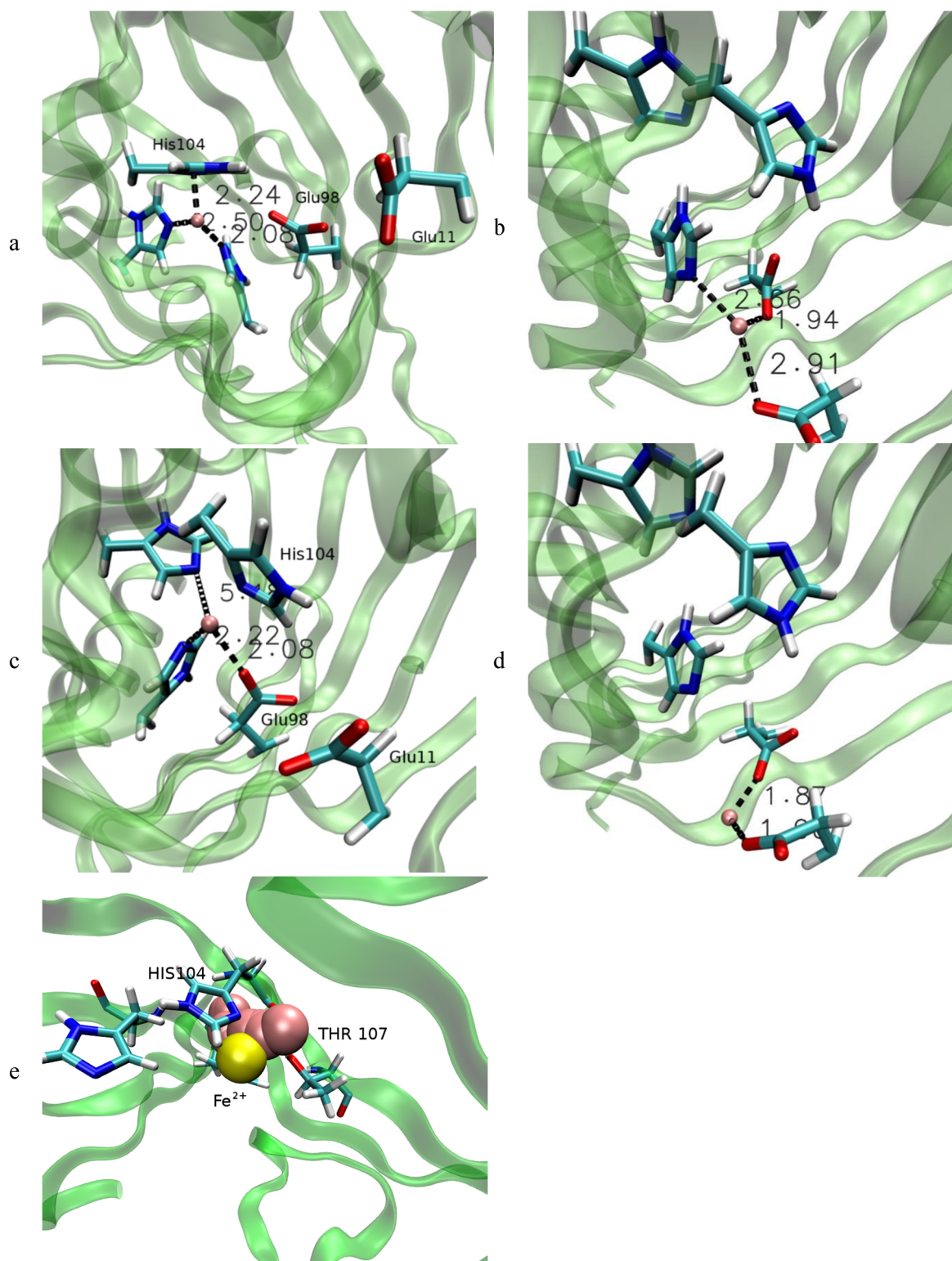
**Tablica 3.9.** Položaji  $\text{Fe}^{2+}$  (i njihova populacija) po završetku RAMD simulacija. Za svaki varijant enzima izvedeno je 16 nezavisnih simulacija. Za slučajeve kada je metalni ion izbačen izvan proteina broj izlazaka kroz tunel T2 (slika 3.6.) dan je u uglatoj zagradi

| $\text{Fe}^{2+}$ položaj     | WT    | Arg80Ala       | Glu98Gln | Tyr70Ala |
|------------------------------|-------|----------------|----------|----------|
| Izvan proteina [pored Glu11] | 2 [2] | 5 <sup>h</sup> | 3 [2]    | 4 [3]    |
| Glu11 susjedstvo             | 3     | 4              | 6        | 8        |
| Phe119 i Glu98               | 0     | 3              | 6        | 3        |
| Thr107 i Glu78               | 7     | 0              | 0        | 0        |
| Nasumično                    | 4     | 4              | 1        | 1        |

Tijekom simulacija sustava s mutantima, metalni ion izvan proteina najčešće biva izbačen u blizini Glu11. Ukratko, rezultati upućuju da je mehanizam izlaska  $\text{Fe}^{2+}$  iz aktivnog mjesta usporediv s onim kod nativnog proteina gdje Glu98 regulira izlazak  $\text{Fe}^{2+}$  iz aktivnog mjesta. Scenarij izlaska prikazan je na slici 3.23. U početnoj strukturi željezo je koordinirano sa 3 histidina i jednim glutamatom (slika 3.23.a), nakon toga Glu98 povlači željezo iz aktivnog mjesta, ali je još uvijek koordinirano sa His104 (slika 3.23.b). U trećem koraku Glu98 odvlači  $\text{Fe}^{2+}$  od His104 (slika 3.24.c) prema Glu11 iz susjedne podjedinice (slika 3.23.d) gdje postaje dostupno vanjskom otapalu.

<sup>h</sup> U ovom su mutantu izlazi tunela zbog nepostojanja Arg80 spojeni.





**Slika 3.23.** Prikaz odlaska  $\text{Fe}^{2+}$  (prikazan ružičastom kuglicom) iz aktivnog mjesta; a-d) izlazak potpomognut s Glu98 i s Glu11 iz susjedne podjedinice; e) put koji se zaustavlja pored Thr107. Početni položaj  $\text{Fe}^{2+}$  prikazan je žutom kuglicom, a gibanje tijekom simulacija nizom ružičastih kuglica. Crnim isprekidanim linijama prikazane su veze s aminokiselinskim ostacima koji na pojedinim etapama puta koordiniraju metalni ion.

Osim toga  $\text{Fe}^{2+}$  može biti izbačeno u smjeru Thr107 (preferirani put u nativnom enzimu) kao što je prikazano na slici 3.23.e, gdje niz roza obojenih kuglica predstavljaju gibanje  $\text{Fe}^{2+}$  tijekom RAMD simulacija. Vrlo je zanimljivo da preferirani put u nativnom enzimu vodi pokraj Thr107 (slika 3.23.e) gdje se zaustavlja koordiniran sa bočnim lancima proteinogenih aminokiselinskih ostataka Glu98 i Thr107 dok je koordinacija s histidinima izgubljena (slika 5.2. u dodatku). Značajno je da su i ranije analize ukazale na važnu ulogu Thr107 [15] pri vezanju  $\text{Fe}^{2+}$ .

Scenarij prikazan na slici 3.23. u mutantima Tyr70Ala i Arg80Ala dodatno je olakšan povećanom mobilnosti Glu98. Povećana mobilnost Glu98 kod mutanata Tyr70Ala i Arg80Ala dodatno potencira način prijenosa  $\text{Fe}^{2+}$  izvan aktivnog mjesta kakav je prikazan na slici 3.23. a-d. U mutantima Tyr70Ala i Arg80Ala Glu98 je slobodniji i lakše se reorijentira nego u nativnom proteinu što potencira njegovu ulogu u prijenosu metalnog iona u područje izvan aktivnog mjesta. Iako Gln u Glu98Gln mutantu ne koordinira metalni ion tako dobro kao Glu (tablica 3.7.) još uvijek je njihova interakcija dovoljno snažna, pa slično kao Glu i Gln98 sudjeluje u izvlačenju  $\text{Fe}^{2+}$  iz aktivnog mjesta enzima, tim više što tijekom MD simulacija Arg80 ne stabilizira Gln98. Tijekom simulacija sustava s Glu98Gln mutantom jedna trećina metalnih iona prešla je iz aktivnog mjesta u vezno mjesto pored Glu11 iz susjedne podjedinice, a trećina se pomaknula u smjeru Phe119 (tablica 3.7.; slika 6.3. u dodatku).

U nekim slučajevima željezo je izbačeno izvan proteina. Kod nativnog enzima to se dogodilo kroz vodeni tunel T2 (tablica 3.9.). Kod Arg80Ala mutanta, nedostatak velike polarne gvanidino skupine rezultira lokalnim promjenama strukture enzima uslijed čega dolazi do spajanja tunela T1 i T2 u prostrano područje podesno za transport liganada što se podudara sa povećanim brojem izlazaka željeznog iona u tom mutantu.

#### 3.1.5.5. Ulazak $\text{Fe}^{2+}$ u protein

Izvan proteina ion željeza je hidratiziran, pa zato takav ulazi u protein. Kako bi proučavali njegovu migraciju do aktivnog mjesta, željezo je postavljeno unutar tunela kojim molekule vode dolaze/odlaze do aktivnog mjesta. Kao početni položaj izabran je položaj molekule vode u blizini kisika (na udaljenosti do 2,5 Å) hidroksilne skupine Tyr70. Tyr70 je sastavni dio oba tunela kojima molekule vode dolaze do aktivnog mjesta te gotovo sve molekule vode koje iz okolnog otapala putuju do aktivnog mjesta enzima prolaze pored njega. Takvi sustavi su simulirani 16 ns bez primjene veznih parametara na ion željeza. U nativnom

enzimu željezo je iz vodenog kanala u specifično, 3His + Glu98, vezno mjesto doputovalo u 8 od 12 slučajeva kao što je prikazani u tablici 6.6. u dodatku. U dva slučaja ion željeza „zapeo je“ na površini proteina, a u dva slučaja se smjestio u blizini Glu11 iz susjedne podjedinice. Tijekom simulacija sustava u kojima se u specifičnom veznom mjestu već nalazio ion željeza, sam, ili sa supstratom, željezo iz tunela najčešće je svoje putovanje kroz enzim završilo vezano za Glu11/Glu98.

Na ovim sustavima izračunate su slobodne energije vezanja hidratiziranog metalnog iona za enzim korištenjem MM-PBSA metode. Za račun je korišteno 50 struktura uzorkovanih, u jednakim vremenskim razmacima, tijekom posljednje nanosekunde (šesnaeste) MD simulacija. Budući da energije vezanja značajno ovise o početnoj strukturi enzima i položajima metalnog iona, istraživanje smo ograničili na strukture u kojima se početne strukture enzima i početni položaji  $\text{Fe}^{2+}$  iona ne razlikuju više od 1 Å. Najniža energije izračunata je za vezanje hidratiziranog željeznog iona ( $\text{Fe}^{2+}$  koordiniran sa dvije molekule vode) u podjedinicu C prirodnog enzima. Nakon toga slijedi energija vezanja hidratiziranog  $\text{Fe}^{2+}$  u A podjedinicu mutanta Tyr70Ala (+19,4 kcal/mol) te u B podjedinicu Arg80Ala (+21,0 kcal/mol) i na posljetku u D podjedinicu mutanta Glu98Gln (+31,0 kcal/mol). Sve izračunate energije sumirane su u tablici 3.10.

**Tablica 3.10.** Relativne energije (kcal/mol) za kompleks  $\text{Fe}^{2+}+2\text{H}_2\text{O}$  u različitim Dke1 varijantima. Energija je izračunata za svaki lanac (A-D) koristeći MM-PBSA pristup. Energija vezanja metalnog iona u podjedinicu C nativnog enzima korištena je kao referentna vrijednost.

| Varijant | A    | B    | C    | D    | Srednja vrijednost |
|----------|------|------|------|------|--------------------|
| WT       | 24,4 | 6,7  | 0,0  | 32,0 | 15,8               |
| Tyr70Ala | 19,4 | 46,9 | 42,4 | 35,4 | 36,0               |
| Arg80Ala | 44,5 | 21,0 | 27,4 | 37,2 | 32,5               |
| Glu98Gln | 60,2 | 43,6 | 45,3 | 31,0 | 45,0               |

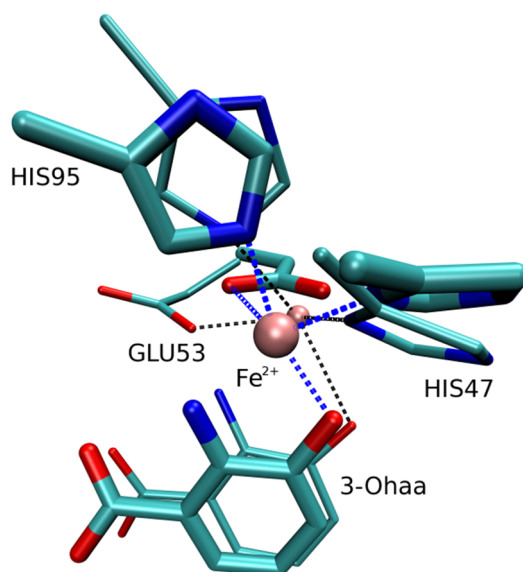
Afiniteti vezanja hidratiziranog metalnog iona ( $K_a \propto e^{-\Delta G/kT}$ ) izračunati MM-PBSA metodom u skladu su s eksperimentalnim rezultatima (tablica 6.7. u dodatku) [101], tj. koreliraju s mjerenjima sadržaja  $\text{Fe}^{2+}$  (FereneS i ICP-MS) te s disocijacijskim konstantama izmjerenim za dvovalentne katione bakra i željeza ( $K_a \propto 1/K_d$ ; tablica 6.5. u dodatku). Afinitet vezanja  $\text{Fe}^{2+}$  izračunat korištenjem MM-PBSA metodom najviši je za nativni protein, a nakon toga slijede Arg80Ala i Tyr70Ala te Glu98Gln.

### 3.2. 3,4-dioksigenaza 3hidroksiantranilne kiseline (3HAO)

3-hidroksiantranilat 3,4-dioksigenaza (3HAO) je o željezu ovisna dioksigenaza koja katalizira razgradnju benzenskog prstena 3-hidroksiantranilne kiseline (3-Ohaa), jednog od intermedijera u kinureninskom putu (shema 1.1.). Cilj istraživanja bio je ispitati na koji način vezanje supstrata (3-Ohaa) utječe na strukturu i dinamička svojstva enzima, te pojasniti razloge smanjene katalitičke učinkovitosti točkastih mutanata utvrđenih za bakterijski ortolog.

#### 3.2.1. Vezanje supstrata za 3HAO i njegov utjecaj na strukturu i dinamička svojstva proteina

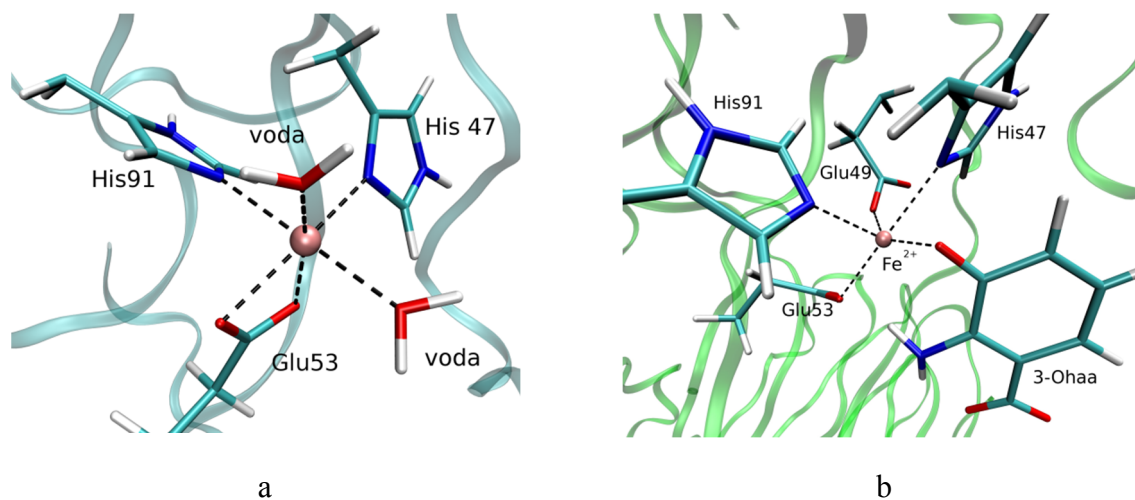
Struktura kompleksa humanog 3HAO sa supstratom (3-Ohaa) nije eksperimentalno određena već je sagrađena primjenom metode uklapanja (Autodock vina 1.1.2. [68]) pri čemu je kao uzorak korištena struktura kompleksa bakterijskog ortologa (PDB kod 1YFY) (slika 3.24.). Računalne simulacije provedene su za humani 3HAO enzim a eksperimentalne mutacijske analize rađene na bakterijskom enzimu [23].



**Slika 3.24.** Prikaz preklopljene koordinacije metalnog iona za humani 3HAO (tanja štapićasta reprezentacija, manja kuglica), i bakterijski ortolog (deblja štapićasta reprezentacija, veća kuglica). Koordinacija metalnog iona naznačena je isprekidanim linijama, plavim kod bakterijskog ortologa, crnim kod humanog 3HAO. Brojevi aminokiselinskih ostataka prikazani su samo za humani ortolog

Ligand je u aktivnom mjestu vezan na način da kisik s deprotonirane OH skupine, O<sup>-</sup>, koordinira metalni ion, dok je NH<sub>2</sub> skupina okrenuta prema aminokiselinskom ostatku Glu53. Osim navedenih, značajnu elektrostatsku interakciju ligand ima s Arg43.

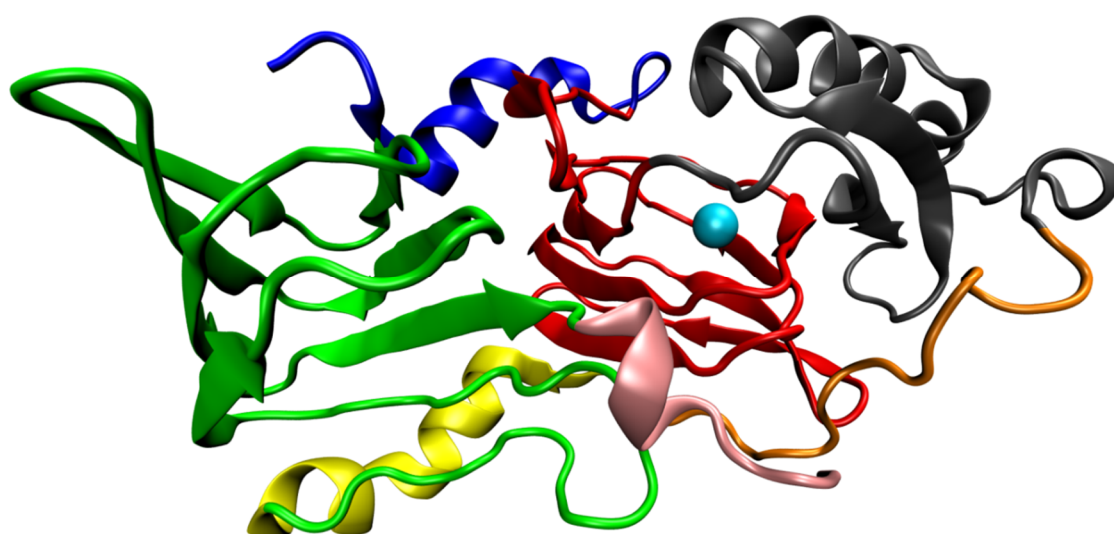
U eksperimentalno određenoj strukturi humanog 3HAO metalni ion (Ni<sup>2+</sup>) koordiniran je s dva histidina (His47 i His91) i s Glu53 koji u koordinaciji sudjeluje bidentatno. Tijekom MD simulacija (Ni<sup>2+</sup> zamijenjen s Fe<sup>2+</sup>) molekule vode slobodno ulaze u koordinacijsku sferu željeznog iona koje postaje 6 koordinirano (slika 3.25.a). Vezanjem supstrata u aktivno mjesto pristup molekulama vode je sterički bitno otežan te dolazi do značajne promjene u koordinacijskoj sferi metala koja postaje hidrofobnija, Glu53 više ne koordinira metalni ion bidentatno, nego monodentatno, a u koordinacijsku sferu metala ulazi jedan karboksilni kisik Glu49 (slika 3.25.b). Tijekom gotovo 90% vremena simulacije kompleksa ion željeza je bio pentakoordiniran. Naime, za dvije molekule vode, koje su tijekom većine vremena trajanja MD simulacija „slobodnog“ enzima koordinirale metalni ion (67,7% vremena simulacija), vezanjem liganda u aktivno mjesto dolazi do blokade njihovih veznih mjesta, te u koordinacijskoj sferi metalnog iona u kompleksu tijekom 85,2% vremena simulacija nema molekula vode. Na slici 3.25. prikazan je najzastupljeniji oblik koordinacije metalnog iona u „slobodnom“ proteinu (a) i u kompleksu s 3-Ohaa (b).



**Slika 3.25.** Prva koordinacijska sfera divalentnog kationa željeza kod humanog 3HAO a) sustav bez vezanog supstrata; b) s vezanim 3-Ohaa; crnim isprekidanim linijama naznačene su udaljenosti atoma liganada od Fe<sup>2+</sup> manje od 2,5 Å.

3HAO je u svom aktivnom obliku monomer sastavljen od dviju beta bačvica povezanih alfa uzvojnicom. Kako bi lakše pratili utjecaj liganda i točkastih mutacija na

strukturu enzima podijelili smo ga prema elementima sekundarne strukture te prema položaju aminokiselina u slijedu, na sedam logičnih cjelina (slika 3.26.). Područja, redom, čine N-terminal (aminokiselinski ostatci 1-23, plavo obojen), koji je spojen na beta bačvicu u kojoj se nalazi aktivno mjesto (aminokiselinski ostatci 24-107, crveno). Slijedi sivo obojena alfa uzvojnica (aminokiselinski ostatci 108-165), te narančasto obojena petlja (aminokiselinski ostatci 166-180) i alfa uzvojnica (aminokiselinski ostatci 181-197, žuto) spojena na drugu beta bačvicu (aminokiselinski ostatci 198-278, zeleno) na koju se nastavlja roza obojena petlja na C-terminalu (aminokiselinski ostatci 279-286).

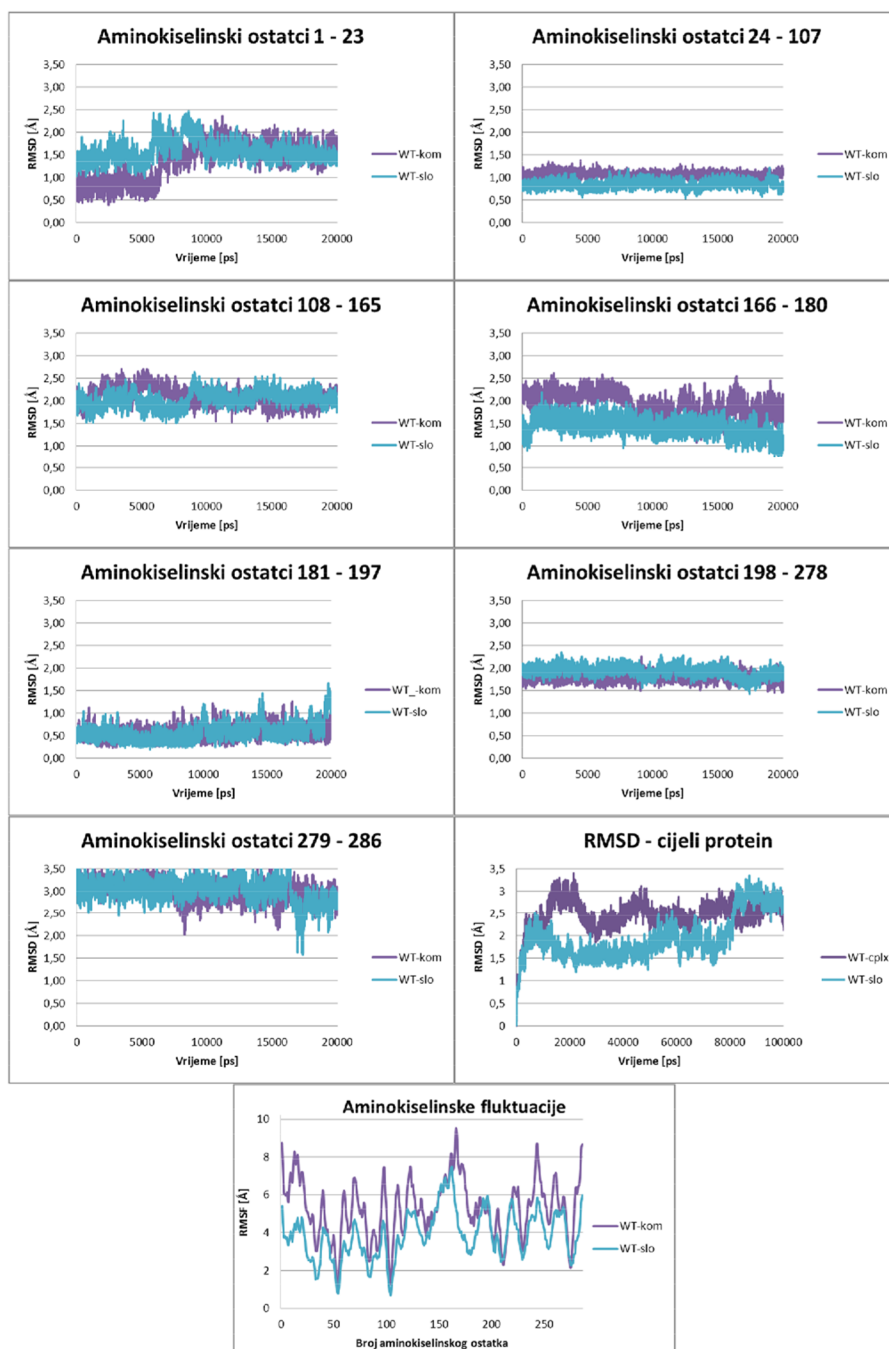


**Slika 3.26.** Prikazana je podjela proteina prema elementima sekundarne strukture i položaju aminokiselinskih ostataka u slijedu. Svako od 7 područja obojeno je drugom bojom. Metalni ion prikazan je kao tirkizna kugla.

Utjecaj supstrata na strukturu i dinamička svojstva enzima analiziran je praćenjem strukture pojedinih područja proteina prema podjeli na slici 3.26. Budući da je vrijeme simulacija dugo, analize smo usmjerili na posljednjih 20 ns simulacija. Grafovi na slici 3.27. prikazuju odnos srednjeg kvadratnog pomaka (RMSD) sustava bez i s vezanim ligandom (3-Ohaa). Iz tih se grafova može primijetiti da vezanje liganda ne utječe bitno na sekundarnu i trodimenzionalnu strukturu proteina, odnosno da se struktura enzima tijekom MD simulacija nije bitno promijenila. Iznimka je spojno područje 166-180, koje je u potpunosti izloženo otapalu, te vezanjem liganda postaje nešto nestabilnije. RMSD analiza rađena na kompletnim sustavima, pokazala je da je tijekom prvih 80 ns „slobodan“ enzim vrlo stabilan, te da se njegova konformacija nije bitno promijenila u odnosu na onu u kristalu (RMSD 1,5-2,0 Å). Nakon 80. ns dolazi do promjene konformacije koja se očituje u promjeni međusobnog

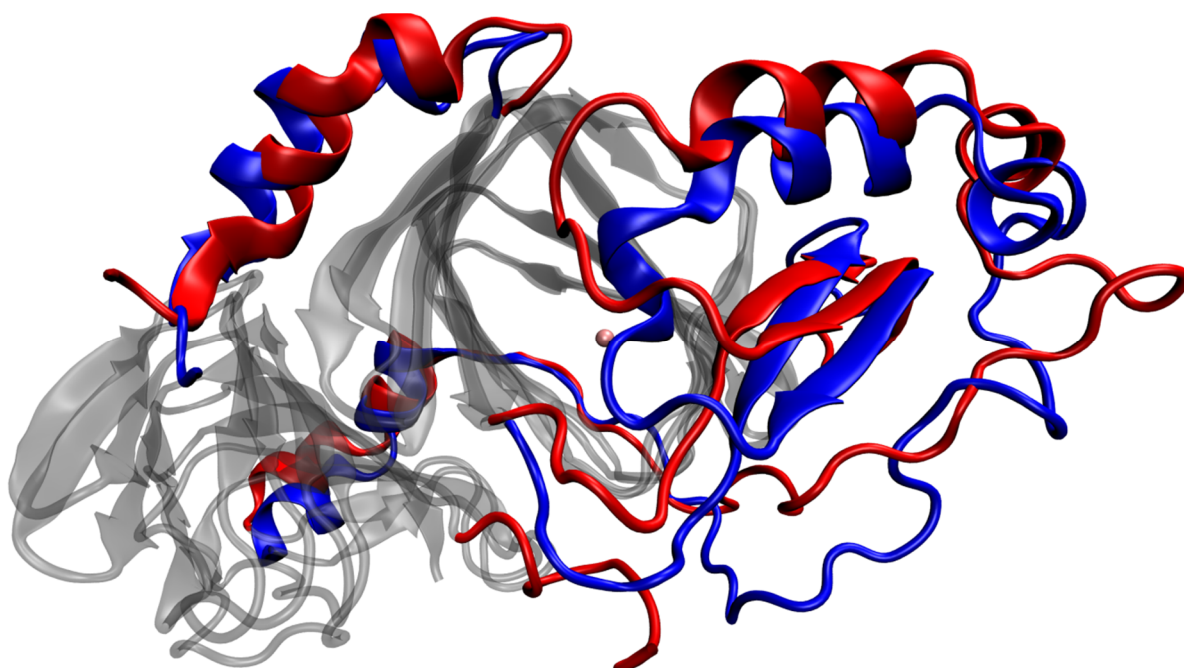


položaja sekundarnih struktura proteina, točnije alfa uzvojnica koje mijenjaju svoj položaj u odnosu na beta bačvice. Beta bačvice ostaju u jednakom relativnom odnosu, što je vidljivo iz slika 3.27 i 3.28.



**Slika 3.27.** Usporedne vrijednosti srednjeg kvadratnog pomaka za 3HAO bez (svijetloplava linija), i s vezanim supstratom, 3-Ohaa, (ljubičasta linija) tijekom posljednjih 20 ns od ukupno 100 ns MD simulacija. Na grafu u četvrtom redu desno prikazan je RMSD za cijeli protein tijekom čitavih 100 ns MD simulacija. Slika na dnu prikazuje aminokiselinske fluktuacije tijekom posljednjih 20 ns.

Do značajne promjene konformacije proteina s vezanim supstratom dolazi već tijekom prvih 20 ns MD simulacija. Iz slike 3.28. vidljivo je da su strukture beta bačvica (prikazane u sivoj prozirnoj reprezentaciji) zadržale svoje relativne položaje, kao i u sustavu bez liganda. Vezanjem supstrata položaji alfa uzvojnica promijene se u odnosu na početne oko 2 Å. Najznačajnije su promjene u položaju C-terminala, i petlji (aminokiselinski ostatci 166-180), koji su u promatranim strukturama proteina iznose u prosjeku 5,5 Å. Analiza aminokiselinskih fluktuacija tijekom MD simulacija ukazuje na povećanu mobilnost upravo tih petlji (166-180) nakon što je u protein vezan supstrat.



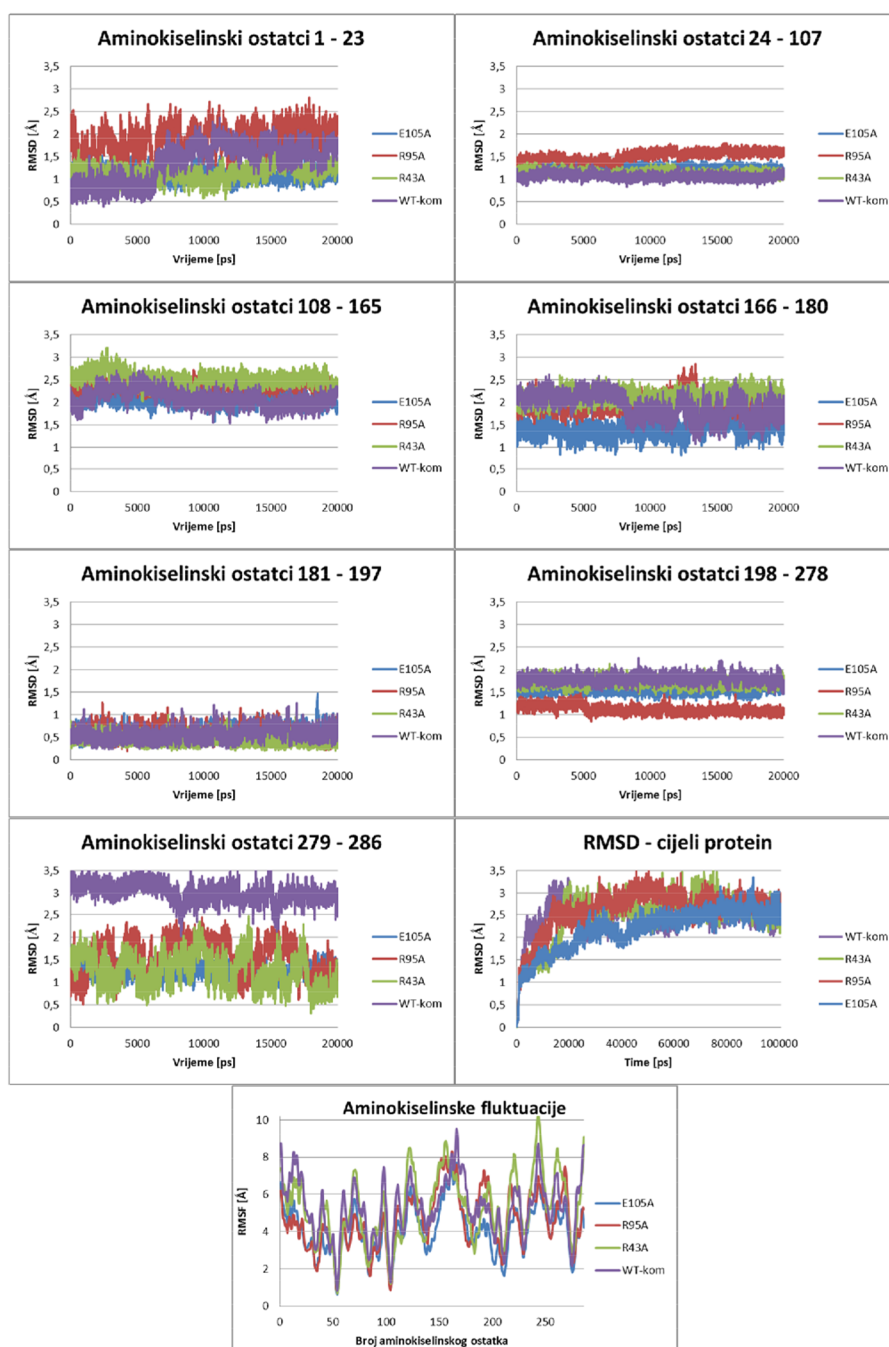
**Slika 3.28.** Preklopljene konačne strukture „slobodnog“ proteina (crveno) i kompleksa s 3-Ohaa (plavo). Sivom prozirnom reprezentacijom prikazane su beta bačvice koje zadržavaju svoj relativni položaj. Metalni ion prikazan je ružičastom kuglicom.

### 3. 2. 2. Utjecaj točkastih mutacija na strukturu, dinamička i termodinamička svojstva kompleksa

Kako bi utvrdili mogu li se računalnim simulacijama na humanom 3HAO utvrditi uzroci smanjenje enzimske aktivnosti kod točkastih mutanata, eksperimentalno utvrđeni za bakterijski ortolog (tablica 6.8. u dodatku), pripremljeni su kompleksi s odgovarajućim mutantima i simulirani tijekom 100 ns. Budući da broj aminokiselinskih ostataka nije jednak u humanom i bakterijskom ortologu, njihovi sljedovi su preklopljeni kako bi u humanom identificirali aminokiselinske ostatke ekvivalentne onima koji su mutirani u eksperimentima



na bakterijskom enzimu. Tako mutanti bakterijskog enzima: Arg47Ala, Arg99Ala i Glu110Ala, za koje su dostupni eksperimentalni rezultati [23] (tablica 6.8. u dodatku), odgovaraju Arg43Ala, Arg95Ala i Glu105Ala mutantima ljudskog 3HAO. Praćena je promjena 3D strukture proteina tijekom čitavog trajanja MD simulacija, te pojedinih regija (slika 3.24) tijekom posljednjih 20 ns MD simulacija i rezultati su prikazani na pripadajućim grafovima (slika 3.29.).



**Slika 3.29.** Usporedne vrijednosti srednjeg kvadratnog pomaka za mutirane komplekse sa 3-Ohaa tijekom posljednjih 20 ns simulacija. Najdonja slika prikazuje aminokiselinske fluktuacije tijekom posljednjih 20 ns

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da mutacije ne utječu na trodimenzionalnu strukturu pojedinih dijelova proteina. Jedina značajnija razlika je u ponašanju C terminala (aminokiselini ostatci 278-286), koji je u potpunosti izložen otapalu te se u nativnom sustavu vidi povećana fleksibilnost tog dijela proteina. Zastupljenost sekundarnih struktura u pojedinim varijantima, određena za optimizirane konformere dobivene nakon 100 ns MD simulacija, također upućuju na zaključak da navedene točkaste mutacije ne utječu na stabilnost pojedinih regija (tablica 3.11.).

U tablici 3.12. dani su koordinacijski brojevi željeznog iona u simuliranim sustavima. U nativnom sustavu bez vezanog supstrata (3-Ohaa)  $\text{Fe}^{2+}$  je izložen otapalu, pa se molekule vode iz okoline proteina tijekom simulacija učestalo izmjenjuju u njegovoj koordinaciji čineći ga pretežno heksakoordiniranim. Vezanjem supstrata koordinacijski broj se smanjuje na 5. Naime supstrat koordinira  $\text{Fe}^{2+}$  samo s jedim atomom kisika, a prostor za vezanje molekula vode znatno je smanjen (tablica 3.13.). Mutiranjem Glu105 u Ala afinitet aktivnog mjesta prema molekulama vode znatno se povećava. Tijekom MD simulacija kompleksa s Glu105Ala mutantom samo 26% vremena u koordinaciji  $\text{Fe}^{2+}$  ne sudjeluje ni jedna molekula vode (tablica 3.13.). Nasuprot tome kod kompleksa s nativnim proteinom tijekom 86% vremena trajanja MD simulacija u koordinacijskoj sferi  $\text{Fe}^{2+}$  nema molekula vode.

**Tablica 3.11.** Zastupljenost sekundarnih struktura u simuliranim sustavima nakon završetka MD simulacija

| Postotak sekundarnih struktura u završnoj strukturi | „slobodni“ enzim | Kompleksi varijanata 3HAO s 3-Ohaa |          |          |           |
|---|------------------|------------------------------------|----------|----------|-----------|
|   |                  | 3HAO                               | Arg43Ala | Arg95Ala | Glu105Ala |
| Alfa uzvojnica                                      | 10,8             | 12,2                               | 10,5     | 8,7      | 12,2      |
| 3 dijelna uzvojnica(G)                              | 2,1              | 2,4                                | 3,1      | 5,2      | 4,5       |
| Beta ploča (E)                                      | 40,9             | 40,2                               | 43,7     | 43,0     | 44,1      |
| Beta Namotaj (T)                                    | 26,2             | 24,5                               | 23,8     | 20,6     | 18,9      |
| Beta spirala(C)                                     | 19,2             | 20,6                               | 18,9     | 21,7     | 20,3      |

**Tablica 3.12.** Broj atoma koji koordiniraju  $\text{Fe}^{2+}$  tijekom simulacija. Dan je postotak ukupnog vremena simulacije u kome je pojedina koordinacija bila zastupljena.

| Koordinacijski broj | slobodni % | Kompleks % | Arg43Ala % | Arg95Ala % | Glu105Ala % |
|---------------------|------------|------------|------------|------------|-------------|
| 4                   | 0,3        | 1,6        | 0,9        | 0,5        | 2,1         |
| 5                   | 32,9       | 89,7       | 93,9       | 95,7       | 76,3        |
| 6                   | 66,7       | 8,7        | 5,2        | 3,8        | 21,6        |
| 7                   | 0,1        | 0,0        | 0,0        | 0,0        | 0,0         |

Preklapanjem konačnih struktura MD simulacija za svaki od mutanata utvrđeno je da mutacijom Glu105 u Ala, Glu53 izlazi iz koordinacijske sfere  $\text{Fe}^{2+}$  te tako on postaje izloženiji otapalu. Izlazak Glu53 iz koordinacijske sfere metalnog iona kompenzira se dolaskom jedne molekule vode u koordinacijsku sferu metala, što se može vidjeti u tablici 3.13. Kod argininskih mutanata nije došlo do značajnijih promjena u koordinaciji metalnog iona, kao ni u načinu vezanja supstrata iako je eksperimentalnim mjerenjima pokazano da se njihovom mutacijom aktivnost enzima smanjuje za četiri reda veličine [23]. Jedan od uzroka tome mogao bi biti smanjeni afinitet tih mutanata prema supstratu, 3-Ohaa što se može naslutiti iz  $K_m$  vrijednosti (tablica 6.8. u dodatku).

**Tablica 3.13.** Broj molekula vode koje koordiniraju  $\text{Fe}^{2+}$

| broj voda | slobodni % | kompleks % | Arg43Ala % | Arg95Ala % | Glu105Ala % |
|-----------|------------|------------|------------|------------|-------------|
| 0         | 0,1        | 85,2       | 94,4       | 87,4       | 26,1        |
| 1         | 32,1       | 14,8       | 5,6        | 12,6       | 56,4        |
| 2         | 67,7       | 0,0        | 0,0        | 0,0        | 17,5        |
| 3         | 0,1        | 0,0        | 0,0        | 0,0        | 0,1         |

Slobodne energije vezanja supstrata, 3-Ohaa, izračunate su za sve varijante korištenjem 50 struktura uzorkovanih tijekom posljednje dvije nano sekunde, od ukupno 100 ns, MD simulacija u jednakim vremenskim razmacima. Pri računima slobodne energije vezanja najprije je izračunata slobodna energija vezanja molekula vode za metalni ion, na način da su vode koje su tijekom dvije nanosekunde bile više od 30% vremena u koordinacijskoj sferi metala definirane kao ligand. Kod svih kompleksa molekule vode koje su tijekom posljednje dvije nanosekunde bile više od 30% vremena u neposrednoj interakciji sa supstratom smatrane su dijelom receptora. Rezultati u tablici 3.14. prikazuju razliku vezanja supstrata i molekula vode korištenjem gore opisanog postupka. Iz rezultata se može

zaključiti da je vezanje supstrata za nativni protein povoljnije (ima nižu energiju vezanja) od vezanja za argininske mutanate što je u korelaciji s eksperimentalnim rezultatima [23].

**Tablica 3.14.** Rezultati računa slobodne energije vezanja, za različite varijante. WT\* označuje enzim bez vezanog supstrata.

|                                      | WT*                      | WT                          | Arg43Ala                    | Arg95Ala                    | Glu105Ala                   |
|--------------------------------------|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|                                      | $\Delta G_{\text{voda}}$ | $\Delta G_{\text{liganda}}$ | $\Delta G_{\text{liganda}}$ | $\Delta G_{\text{liganda}}$ | $\Delta G_{\text{liganda}}$ |
| Energija liganda [kcal/mol]          | 210,9                    | 310,2                       | 320,8                       | 373,5                       | 301,2                       |
| Slobodna energija vezanja [kcal/mol] | 0,0                      | 99,3                        | 109,9                       | 162,6                       | 90,3                        |

### 3.2.3. Modeliranje enzimske reakcije

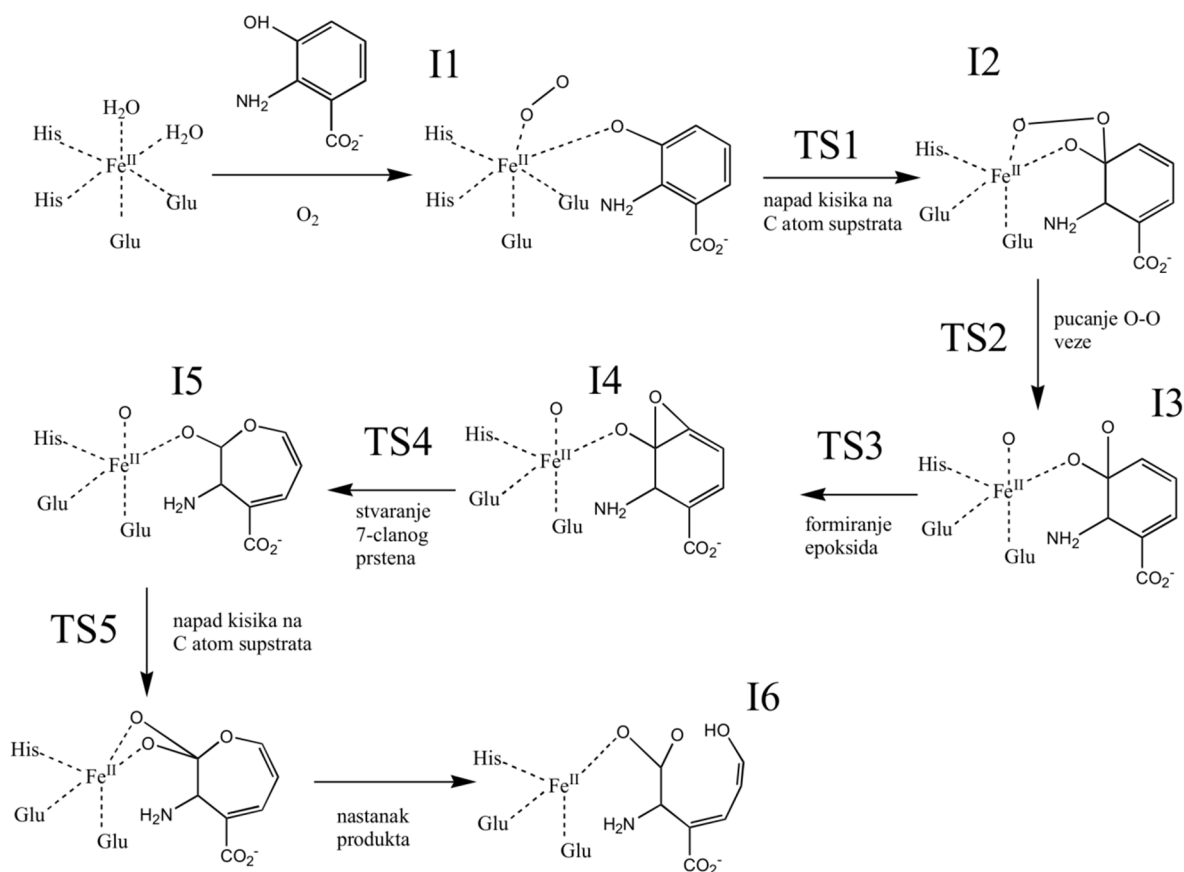
Reakciju oksidativne razgradnje 3-hidroksiantranilne kiseline kataliziranu od strane ljudskog 3HAO proučavali smo na modelnom sustavu i na čitavom enzimu, korištenjem „sken“ metode, pri čemu su početne konformacije određene na temelju MD simulacija. Kako bi ispitali pretpostavljeni mehanizam reakcije udaljenosti između atoma koji neposredno interagiraju mijenjane su u diskretnim koracima i praćena je promjena energije sustava. Pri odabiru duljine koraka treba biti pažljiv, jer ukoliko je udaljenost velika, a korak mali, računi će iznimno dugo trajati, a ako je udaljenost među atomima mala, a korak veliki, krivulja potencijalne energije neće imati zadovoljavajući oblik. U disertaciji je ovisno o geometriji korišten korak od 0,1 do 0,01 Å.

#### 3.2.3.1. Kvantno mehanički računi

Kvantno mehanički računi provedeni su na modelnom sustavu čija se početna struktura sastoji od 76 atoma, a na mjestima gdje su aminokiselinski ostatci „odsječeni“, dodan je H atom radi popunjavanja valentne ljuske C atoma (slika 2.2.). U prvom koraku provedeni su računi u plinskoj fazi, a u drugom je otapalo simulirano pomoću CPCM modela. Naboj sustava iznosio je -1, a multiplicitet 5. Gibanja krajnjih CH<sub>3</sub> skupina nisu bila ograničena.

### 3.2.3.1.1. Računi u plinskoj fazi

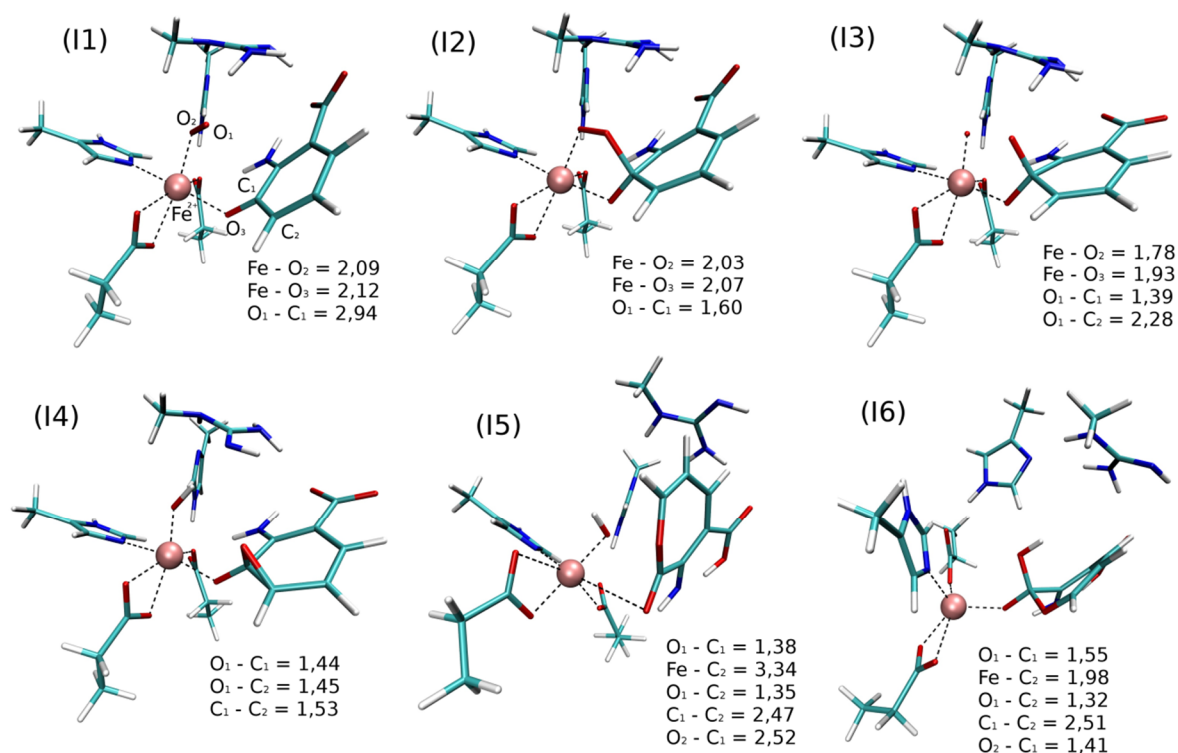
Za optimizaciju sustava korišten je DFT (B3LYP) funkcional i bazni skup 6-31G(d,p) za sve atome osim  $\text{Fe}^{2+}$  za koji je korišten SDD. Optimizacijom inicijalnog sustava dobiven je I1 (slika 3.30., shema 3.1.) minimum koji je poslužio kao početna točka za modeliranje reakcije prema predloženoj shemi (shema 2.1.). U prvom koraku reakcije atom kisika iz molekule  $\text{O}_2$ , koji nije vezan za  $\text{Fe}^{2+}$ , privlačen je, s početne udaljenosti od 2,94 Å (slika 3.30.), prema atomu ugljika na koji je vezana OH skupina. U minimumu dobivenom nakon prvog prijelaznog stanja energije 11,9 kcal/mol (tablica 3.15. slika 3.31.) udaljenost između navedenih atoma, kisika i ugljika, je 1,65 Å. U slijedećem koraku došlo je do pucanja O-O veze te su atomi kisika u međuproduktu I3, dobivenom nakon TS2 (energije 19,2 kcal/mol) međusobno udaljeni 2,16 Å.



**Shema 3.1.** Dobiveni reakcijski put za oksidaciju 3-hidroksiantranilne kiseline u 2-amino 3-mukonat semialdehid kataliziranu od strane 3HAO enzima

**Tablica 3.15.** Relativne energije dobivene modeliranjem reakcije u plinskoj fazi i uz simulaciju otapala CPCM modelom.

|                             | Stanje          | I1  | TS1  | I2   | TS2  | I3   | TS3  | I4   | TS4  | I5    | TS5   | I6    |
|-----------------------------|-----------------|-----|------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|-------|
| Energija<br>[kcal/<br>molu] | Plinska<br>faza | 0,0 | 11,9 | 12,1 | 19,2 | 15,7 | 14,5 | -5,5 | -4,2 | -31,3 | -29,8 | -41,9 |
|                             | CPCM            | 0,0 | 11,0 | 10,6 | 16,8 | 10,1 | 13,2 | -1,9 | -1,5 | -19,2 | -5,4  | -66,4 |



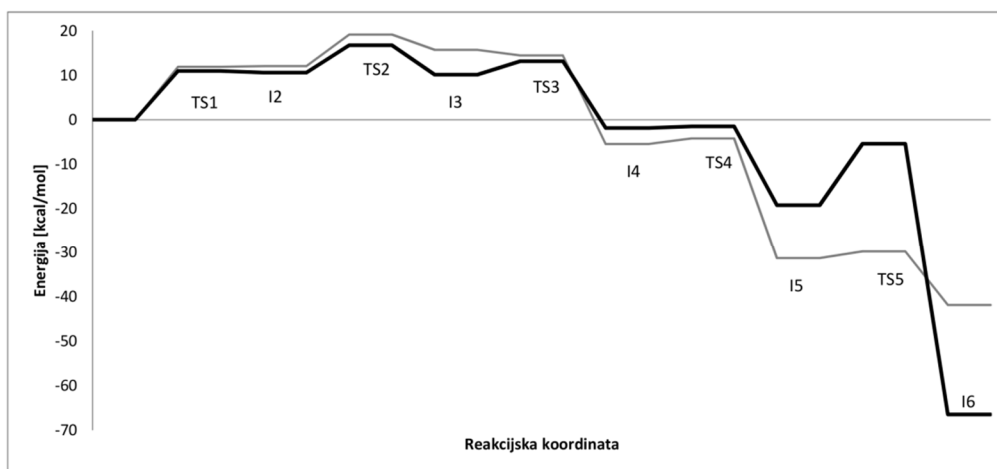
**Slika 3.30.** Optimizirane strukture međuprodukata, minimuma na plohi potencijalne energije, dobivene modeliranjem reakcije u plinskoj fazi. Crnom isprekidanom linijom naznačene su udaljenosti između metalnog iona i atoma koji ga koordiniraju (koji su od njega udaljeni manje od 2,5 Å).

U trećem koraku približavan je kisik koji se prethodno vezao na C (na koji je vezana OH skupina) susjednom C atomu supstrata te je nakon prijelaznog stanja (TS3) energije dobiven benzen oksid (I4) u kome je udaljenost kisika od ciljanog atoma 1,45 Å. Uslijedilo je pucanje anelirane C-C veze benzen oksida te nastank međuprodukta I5 s 2,3-dihidro-oksepinskim prstenom energije -31,3 kcal/mol. U posljednjem koraku drugi atom iz molekule kisika, koji je koordinirao  $\text{Fe}^{2+}$  vezao se na C atom supstrata na kojem se nalazi OH skupina. Istovremeno je došlo do pucanja prstena i nastajanja produkta 2-amino 3-karboksi mukonat semialdehida energije -41,9 kcal/mol. Međustanja dobivena modeliranjem reakcije u plinskoj

fazi prikazana su na slici 3.30., a dobivena reakcijska krivulja na slici 3.31. Potpuni reakcijski put razlikuje se od predloženog (shema 2.1.), koji je prikazan na shemi 3.1.

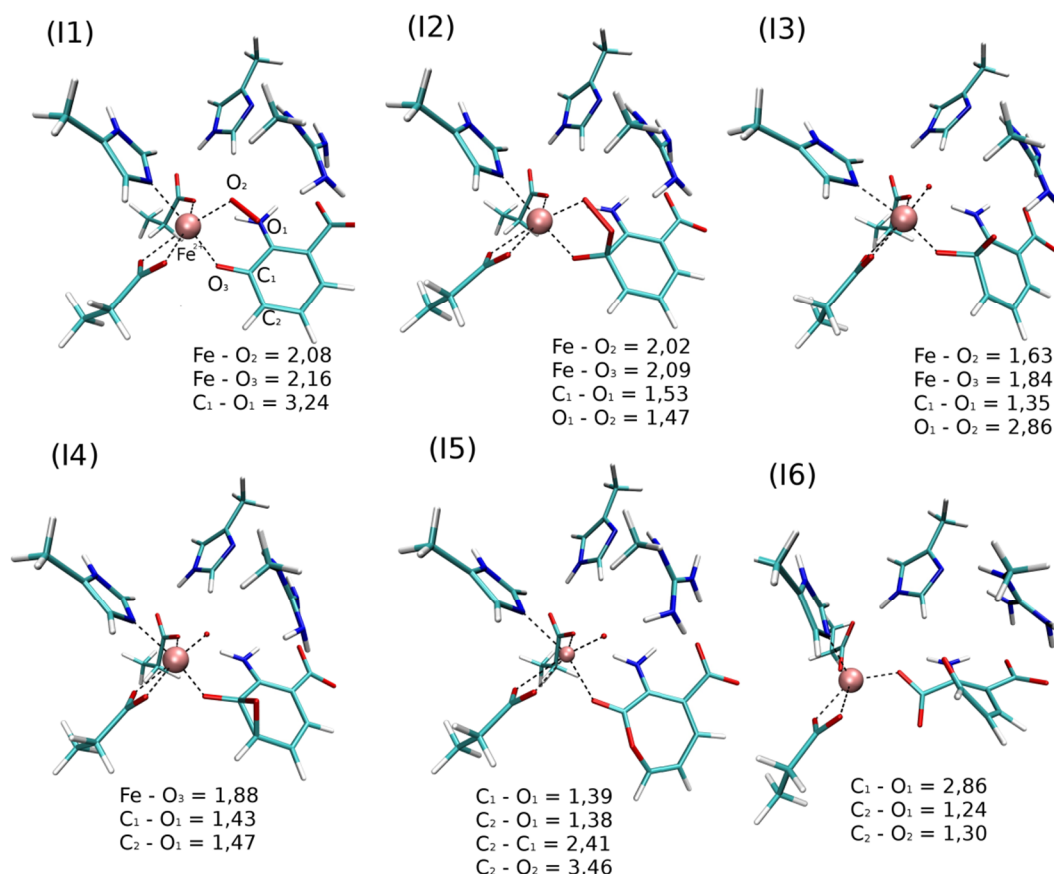
### 3.2.3.1.2. CPCM računi

U CPCM računima reakcija je modelirana na isti način kao u plinskoj fazi (shema 3.1.), a pripadajuće energije za prijelazna stanja i minimume na reakcijskoj krivulji dane su u tablici 3.15. Reakcijska krivulja prikazana je na slici 3.31., a međuprodukti reakcije na slici 3.32.



**Slika 3.31.** Energijski profil reakcije dobiven QM računima, u plinskoj fazi (siva linija) i korištenjem CPCM modela za otapalo (crna linija)

Za prvo prijelazno stanje (TS1) dobivena je energija 11,0 kcal/mol (tablica 3.15, slika 3.31.), a energija pripadajućeg minimuma (I2) je 10,6 kcal/mol. Prijelaznom stanju za pucanje veze u molekuli O<sub>2</sub> (O-O udaljenost iznosi 2,86 Å u prijelaznom stanju TS2, dok je u minimumu I2 ona 1,47 Å) potrebna je energija 6,2, a minimum je na (I3) 10,1 kcal/mol iznad početne točke. Nakon toga uslijedilo je stvaranje benzen oksida, uz energiju aktivacije od 3,1 kcal/mol (TS3), dok sam benzen oksid (I4) leži 1,9 kcal/mol ispod energije reaktanata na plohi potencijalne energije (slika 3.32.). Uslijedilo je pucanje anelirane C-C veze benzen oksida, te nastanak 2,3-dihidro-oksepinskog prstena tako da su susjedni atomi razdvojeni sa 1,50 na 2,41 Å. Za prijelazno stanje toga koraka (TS4) potrebno je 0,4 kcal/mol, a minimum se nalazi na (I5) -19,4 kcal/mol. Na posljetku je kisik koji je vezan na Fe<sup>2+</sup> približen sa 3,6 na 1,3 Å, za što je potrebna energija prijelaznog stanja (TS5) 13,8 kcal/mol, a pripadajući minimum u kojem je nastao produkt nalazi se na (I6) -66,4 kcal/mol.



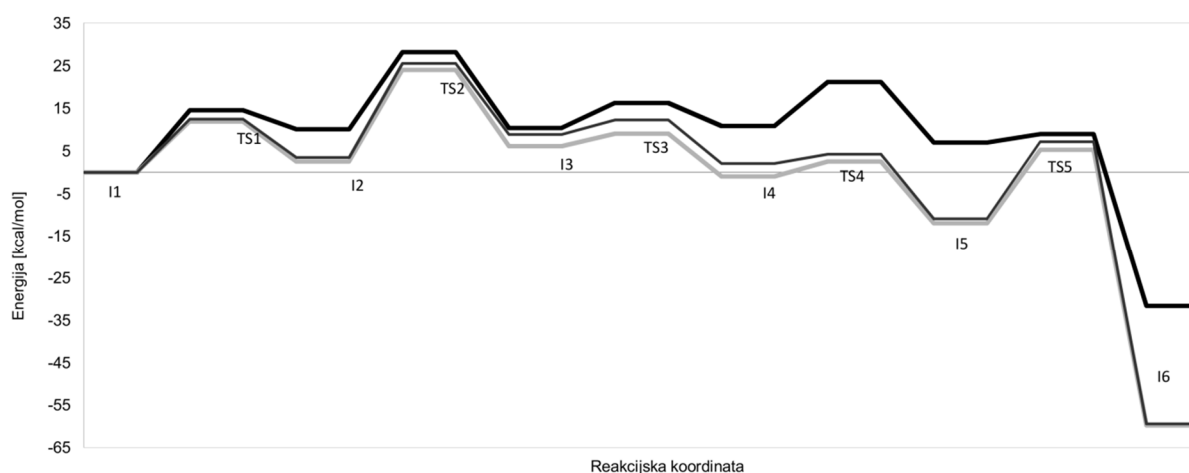
**Slika 3.32.** Reakcijski mehanizam dobiven pomoću CPCM računa. Crnom isprekidanom linijom naznačene su udaljenosti između Fe<sup>2+</sup> i atoma koji su od njega udaljeni manje od 2,5Å

### 3. 2. 3. 2. Kombinirani QM/MM računi

Kvantno mehaničkim računima utvrđen je energijski profil za reakciju na modelnom sustavu. No taj sustav samo donekle oponaša okruženje enzima. Kako bi se što više približili realnom okruženju u kome se enzimska reakcija odvija, u račun je uključen čitav hidratizirani protein koji katalizira reakciju. No, tako veliki sustav s preko 10000 atoma nije moguće tretirati kvantno mehanički, već smo na njega primijenili kombinirani kvantno mehanički-molekulsko mehanički (QM/MM) pristup (slika 1.9.) pri čemu je većina, „MM dio“, sustava tretirana empirijski korištenjem Amber polje sila, a manji, „QM dio“ koji odgovara modelnom sustavu u QM računima, DFT funkcionalom s baznim skupom 6-31G. Nakon što je dobiven potpun reakcijski profil (shema 3.1.), energije stacionarnih točaka su izračunate s proširenim baznim skupom, tzv. 'single point' korekcija. Napravljena su dva single point računa, jedan s TZVP, a drugi s 6-311+G(2d,p) baznim skupom (slika 3.33.).



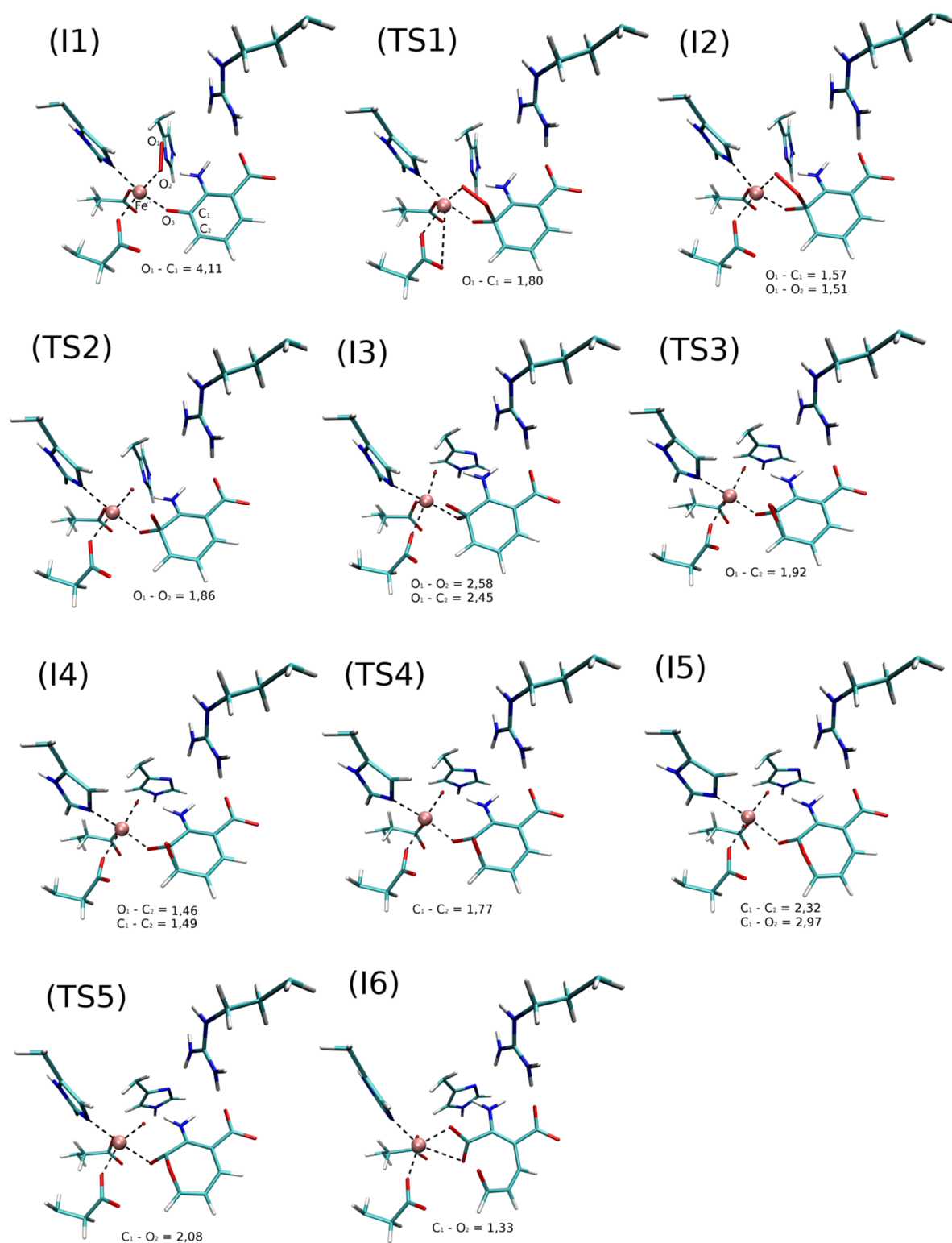
Sam tijek reakcije odgovara onom dobivenom kvantno mehaničkim računima u plinskoj fazi i korištenjem CPCM modela za otapalo (slika 3.34., shema 3.1.). Najviše poteškoće pri određivanju reakcijske krivulje u enzimu imali smo pri optimizaciji početnog sustava budući da molekula kisika koja sudjeluje u reakciji nije mogla doseći optimalan položaj. Tek nakon što smo „ručno“ promijenili položaj kisika (prema položaju kisika u sličnoj reakciji modeliranoj na protokatehual 3,4-dioksigenazi [102]) sustav je uspješno optimiziran i dobivena je početna konformacija za reakciju (I1). Privlačenjem prvog kisika iz O<sub>2</sub> molekule s 4,11 na 1,57 Å prema C(OH) atomu supstrata (slika 3.32.) locirano je prvo prijelazno stanje s relativnom energijom u odnosu na početno od 11,9 kcal/mol (u tekstu se koriste energije dobivene s 6-311+G(2d,p) korekcijom budući da su najbliže očekivanima, energije dobivene računima s ostalim baznim skupovima dane su u tablici 3.16.) te pripadajući minimum energije 2,5 kcal/mol.



**Slika 3.33.** Energijski profil dobiven QM/MM računima. Profil je određen korištenjem 6-31G baznog skupa (crna debela linija). Tanka tamno siva linija predstavlja korekcije dobivene računom energija za stacionarne točke baznim skupom TZVP, dok deblja siva linija predstavlja korekcije dobivene baznim skupom 6-311G+(2d,p).

Nakon toga dolazi do razdvajanja molekule kisika na atome (s međusobne udaljenosti od 1,51 na 2,58 Å) s prijelaznim stanjem TS2 energije 21,6 kcal/mol u odnosu na prethodni minimum, a to je ujedno prijelazno stanje najviše energije. Pripadajući minimum, I3, s relativnom energijom od 6,1 kcal/mol najviši je minimum na reakcijskoj krivulji. Prijelazno stanje pri stvaranju benzen oksida (odnosno približavanja atoma kisika početno vezanom na

C(OH) atom prema susjednom atomu u benzenskom prstenu supstrata s 2,45 na 1,46 Å), TS3, ima relativnu energiju u odnosu na prethodni minimum od 3,0 kcal/mol, a pripadajući minimum (I4) -0,9 kcal/mol.



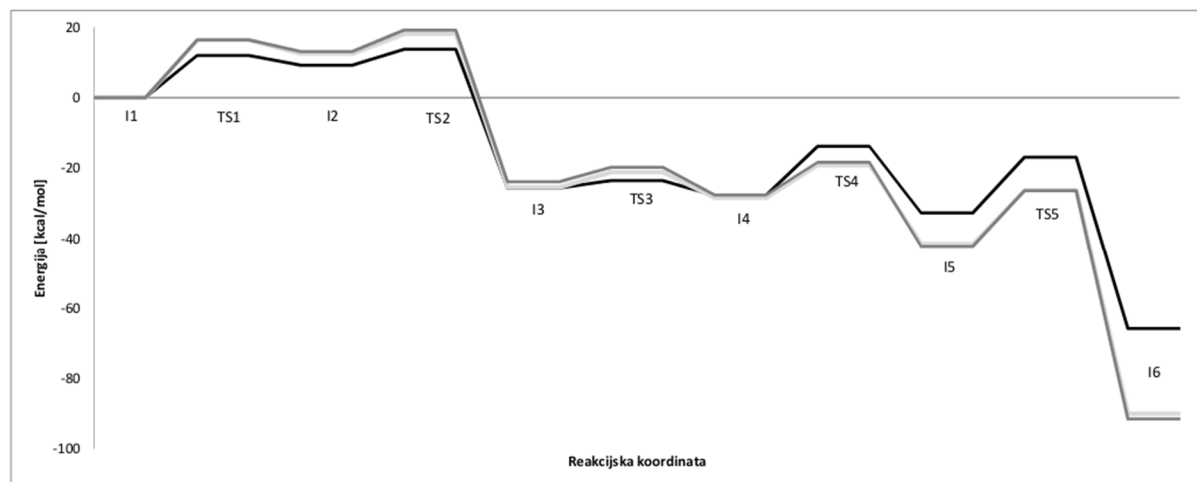
**Slika 3.34.** Strukture svih stacionarnih točaka na plohi potencijalne energije dobivenih QM/MM računom

**Tablica 3.16.** Relativne energije dobivene za QM/MM profil s različitim baznim skupovima

|                            | Stanje            | I1  | TS1  | I2   | TS2  | I3   | TS3  | I4   | TS4  | I5    | TS5 | I6    |
|----------------------------|-------------------|-----|------|------|------|------|------|------|------|-------|-----|-------|
| Energije<br>[kcal/<br>mol] | 6-31G             | 0,0 | 14,5 | 10,1 | 28,2 | 10,4 | 16,2 | 10,8 | 21,1 | 7,0   | 8,9 | -31,6 |
|                            | 6-311<br>+G(2d,p) | 0,0 | 11,9 | 2,5  | 24,1 | 6,1  | 9,1  | -0,9 | 2,6  | -11,9 | 5,3 | -59,8 |
|                            | TZVP              | 0,0 | 12,5 | 3,5  | 25,6 | 8,9  | 12,3 | 2,0  | 4,2  | -10,9 | 7,2 | -59,4 |

Razdvajanje susjednih atoma benzenskog prstena na koje su vezani atomi molekule kisika (s udaljenosti kovalentne veze od 1,49 Å na 2,57 Å) odvija se preko prijelaznog stanja energije 3,5 kcal/mol (TS4) u odnosu na prethodni minimum, a nastali minimum I5 ima relativnu energiju od -11,9 kcal/mol u odnosu na početnu strukturu. Konačno dolazi do napada dugog atoma kisika iz molekule O<sub>2</sub> na supstrat (udaljnost C-O mijenja se s 2,77 na 1,33 Å) pri čemu je za postizanje prijelaznog stanja potrebno 16,2 kcal/mol (TS5), a energija konačnog produkta (I6) je 59,8 kcal/mol niža od energije reaktanta (I1), što je teorijski dokaz da se unutar enzima 3HAO reakcija pretvorbe 3-hidroksiantranilne kiseline u 2-amino 3-hidroksi mukonat semialdehid odvija spontano.

Reakcija (shema 3.1.) je potvrđena i sa elektronskim uklapanjem (EE). Energijski profil prikazan je na slici 3.35., a relativne energije dobivene sa EE i baznim skupom 6-31G te njihova korekcija (sa TZVP i 6-311+G(2d,p)) dane su u tablici 3.17.



**Slika 3.35.** Energijski profil dobiven elektronskim uklapanjem QM/MM računa. Crna linija predstavlja bazni skup 6-31G s kojim je račun izveden, siva linija predstavlja bazni skup TZVP, a svjetlija (deblja) siva 6-311+G(2d,p)

**Tablica 3.16.** Relativne energije dobivene za elektronskim uklapanjem pri QM/MM računima, i njihove korekcije sa 6-311G+(2d,p) i TZVP baznim skupovima

|                            | Stanje            | I1  | TS1  | I2   | TS2  | I3    | TS3   | I4    | TS4   | I5    | TS5   | I6    |
|----------------------------|-------------------|-----|------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Energije<br>[kcal/<br>mol] | 6-31G             | 0,0 | 12,0 | 9,2  | 13,6 | -25,7 | -23,6 | -27,8 | -13,9 | -32,7 | -17,0 | -65,8 |
|                            | 6-311<br>+G(2d,p) | 0,0 | 16,3 | 12,4 | 18,1 | -25,6 | -21,2 | -28,6 | -19,2 | -21,1 | -41,6 | -90,0 |
|                            | TZVP              | 0,0 | 16,3 | 13,0 | 19,1 | -23,9 | -19,8 | -27,7 | -18,4 | -42,3 | -26,5 | -91,5 |

Energije dobivene elektronskim uklapanjem nešto su niže u iznosu od onih dobivenih mehaničkim uklapanjem. Tako je energija najvišeg prijelaznog stanja (TS2) s za 6 kcal/mol niža od ME, a energija produkta za čak 30 kcal/mol (u oba pristupa kao referentna je korištena energija dobivena korekcijom sa baznim skupom 6-311G+(2d,p)). Značajna razlika je i u tome što je u ME računima minimum sa najvišom energijom (I3) 6,1 kcal/mol, dok je u slučaju EE minimum sa najvišom energijom (I2) 12,1 kcal/mol viši od početne energije reaktanata.

Sve stacionarne točke dobivene QM/MM računom potvrđene su frekvencijskom analizom, odnosno minimumi nemaju niti jednu imaginarnu frekvenciju, dok prijelazna stanja imaju točno jednu imaginarnu frekvenciju koja odgovara reakcijskoj koordinati. U računu relativne energije za svako stacionarno stanje u obzir je uzeta i energija vibracija (*engl.* Zero Point Vibrational Energy).

## 4. RASPRAVA

Predmet disertacije bile su dvije ne-hem dioksigenaze, acetil aceton dioksigenaza iz *Acinetobacter* Jonsoii i 3,4-dioksigenaza 3-hidroksiantranilne kiseline. Cilj istraživanja bio je, korištenjem računalnih metoda različitog stupnja složenosti detaljno ispitati njihovu strukturu, dinamička svojstva i funkciju, te pojasniti promjene koje nastaju točkastim mutacijama, a za koje je eksperimentalno utvrđeno da utječu na aktivnost enzima i/ili afinitet prema metalnom ionu. Bitan preduvjet za postizanje navedenog cilja je mogućnost da se sustav pravilno opiše, tj. parametrizira na način koji će omogućiti reprodukciju eksperimentalnih podataka. Parametri za aminokiseline u proteinu su poznati i testirani na mnogim sustavima, no parametri za metalne ione često su neadekvatni, ili, kao što je bio slučaj za  $\text{Fe}^{2+}$  koje nije vezan u hem, ne postoje. Razvoj parametara za  $\text{Fe}^{2+}$  koji moraju biti usklađeni s ostalim parametrima polja sila i istovremeno reproducirati eksperimentalne rezultate bio je prvi korak u izradi disertacije i ujedno veliki izazov. Budući da eksperimenti „promatraju“ uglavnom vremenski prosjek neke pojave, parametri moraju pokazati konzistentnost tijekom duljeg vremenskog razdoblja. Korištenje „konstanti sile“ visoke energije za vezne članove između metalnog iona i njegovih liganda rezultira prevelikom „krutošću“ aktivnog mjesta, tako da efekti koje inače zapažamo MD simulacijama ne mogu doći do izražaja. Osim toga svrha razvoja parametara za ne-hem željezo u proteinu bila je njihova primjena, ne samo u simulacijama sustava s Dke1, na kome su razvijeni, već i s drugim ne-hem enzimima, kao što je i učinjeno tijekom proučavanja humane 3,4-dioksigenaze 3-hidroksiantranilne kiseline. Konačni, vjerodostojni, parametri su dobiveni QM računima na nizu modelnih sustava s različitim okruženjima  $\text{Fe}^{2+}$  (osim aminokiselinskih ostataka za koje je utvrđeno da sudjeluju u koordinaciji metalnog iona, to su reaktant, produkti reakcije i molekule vode) te naposljetku usrednjavanjem svih vrijednosti dobivenih, za pojedini parametar, računima na modelnim sustavima.

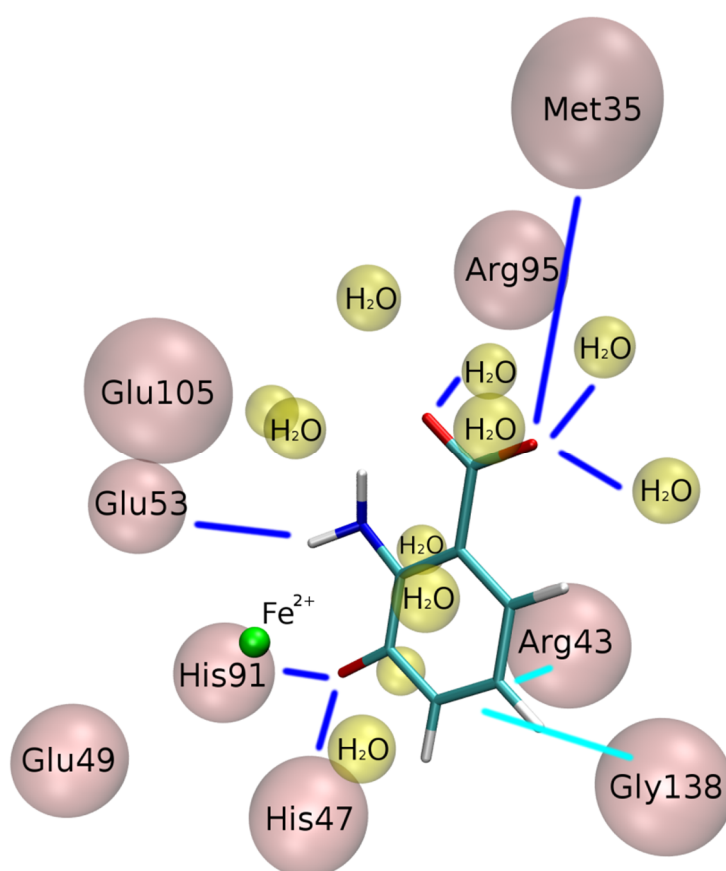
Značajan rezultat disertacije svakako su saznanja o promjeni strukture i dinamičkih svojstava o željezu ovisnih dioksigenaza Dke1 i 3HAO do kojih dolazi uslijed točkastih mutacija i vezanja liganda. Posebno su značajne promjene geometrije aktivnog mjesta koje nastaju pri vezanju supstrata na metalni ion. Pokazano je da je u „slobodnom“ Dke1  $\text{Fe}^{2+}$  osim s 3 histidina, koji se i u kristalnoj strukturi nalaze u njegovoj prvoj koordinacijskoj sferi, koordiniran i s jednim glutamatom. Prije ulaska molekula vode u aktivno mjesto Glu98 je bidentatno koordinirao  $\text{Fe}^{2+}$ , a ulaskom molekule vode u aktivno mjesto koordinacija prelazi u

monodentatnu (slika 3.2.a). Geometrija prve koordinacijske sfere se tijekom simulacija mijenjala između distorzirane oktaedarske i trigonalne bipiramidalne, pri čemu je ion željeza heksakoordiniran tijekom 77% vremena simulacija. Šesti ligand bio je ili druga molekula vode, ili drugi kisik karboksilne skupine Glu98 što rezultira bidentatnim sudjelovanjem tog glutamata u koordinaciji  $\text{Fe}^{2+}$  (slika 3.3.). Kod nativnog 3HAO enzima  $\text{Fe}^{2+}$  je heksakoordiniran tijekom 67,7% vremena simulacija što je usporedivo s rezultatima dobivenim za Dke1 enzim. U prvoj koordinacijskoj sferi  $\text{Fe}^{2+}$  kod 3HAO enzima nalaze se dva histidina i Glu53, koji gotovo cijelo vrijeme koordinira metal bidentatno, pored njih u koordinaciji sudjeluju i dvije molekule vode (tablica 3.13. slika 3.26.).

Vežanje supstrata (PD) u aktivno mjesto Dke1 enzima, rezultiralo je izlaženjem Glu98 iz koordinacijske sfere metala te je tako on postao koordiniran s tri histidina, supstratom (PD) i jednom molekulom vode (slika 3.8.), pri čemu je oktaedarska koordinacija metalnog iona ostala sačuvana. Molekula vode stvara tzv. „zaštićeno stanje“ metalnog iona te je vjerojatnost za reakciju, ukoliko je molekula vode prisutna u aktivnom mjestu, smanjena. Kod 3HAO enzima situacija je nešto drugačija, budući da vežanjem supstrata (3-Ohaa) obje molekule vode napuštaju prvu koordinacijsku sferu metalnog iona te on postaje pretežno pentakoordiniran (89,7% vremena simulacija). Ovo se događa ponajprije zato što vežanjem supstrata prostor za dolazak molekula vode biva smanjen i metal više nije izložen otapalu kao u slučaju slobodnog enzima. Osim toga važno je primijetiti da Glu53 više ne koordinira metalni ion bidentatno, nego monodentatno, ali zato u koordinacijsku sferu ulazi Glu49 koji također monodentatno koordinira metalni ion.

Točkaste mutacije Arg43Ala i Arg95Ala kod 3HAO kompleksa sa 3-Ohaa ne utječu značajno na koordinaciju metalnog iona. Jedina se razlika, u odnosu na slobodni enzim, pojavljuje kod Glu105Ala mutanta, gdje, usprkos vezanom 3-Ohaa, molekule vode sudjeluju u koordinaciji metalnog iona i to jedna 56,4% odnosno dvije 17,5% vremena simulacija. Dolazak vode u aktivno mjesto je posljedica izlaska Glu53 iz koordinacijske sfere metala. Budući da Glu105 i Glu53 u nativnom enzimu interagiraju elektrostatski, mutacijom Glu105 u Ala dolazi do pomicanja bočnog lanca Glu53 prema upražnjenom prostoru, dok metalni ion ostaje u stabilnoj koordinaciji s histidinima. Ti rezultati pružaju pojašnjenje eksperimentalno utvrđene smanjene enzimске aktivnosti Glu105Ala mutanta. Budući da je penta koordinacija  $\text{Fe}^{2+}$  u Glu105Ala – 3-Ohaa kompleksu slabije zastupljena nego u kompleksima s ostalim varijantima vežanje molekule kisika za ion metala otežano je što rezultira smanjenom aktivnošću mutanta. Vjerojatnost reakcije kod ostala tri varijanta nije toliko određena

vjerojatnošću vezanja molekule kisika za metalni ion koliko stabilizacijom prijelaznog stanja. U slučaju 3HAO varijanata relativni odnos energija prijelaznih stanja približno se može aproksimirati relativnim energijama kompleksa sa supstratom. Račun slobodnih energija vezanja supstrata, pri čemu su molekule vode koje interagiraju sa supstratom u aktivnom mjestu promatrane kao dio receptora (slika 4.1.), pokazao je da je kompleks 3-Ohaa s nativnim enzimom stabilniji u odnosu na argininske mutante čime je pojašnjena njihova smanjena katalitička aktivnost. Osim molekula vode koje okružuju supstrat, na slici 4.1. prikazani su aminokiselinski ostatci koji interagiraju sa supstratom, bilo da tvore vodikove veze ili imaju s njim elektrostatske interakcije te na taj način pridonose stabilizaciji supstrata.



**Slika 4.1.** Interakcija supstrata 3-Ohaa s okolnim aminokiselinskim ostacima i molekulama vode. Tamnoplavom linijom prikazane su vodikove veze koje se pojavljuju tijekom MD simulacija, a svijetloplavom elektrostatske interakcije.

Kod Dke1 enzima točkaste mutacije (kako hidrofobne (Phe59Ala, Phe115Ala i Phe119Ala), tako i hidrofilne (Tyr70Ala, Glu98Gln, Arg80Ala)) nisu dovele do promijene koordinacijskog broja metala, a ni do promjene u geometriji prve koordinacijske sfere. Smanjena aktivnost enzima pojašnjena je slabljenjem interakcija između aminokiselinskih

ostataka koji neposredno sudjeluju u reakciji oksidativne razgradnje i čine tzv. katalitičku trijadu (Tyr70, Arg80, Glu98).

Proučavanje vezanja molekula vode i hidratiziranog iona željeza za Dke1 je predstavljalo izazov za modeliranje, a rezultiralo je posebno zanimljivim saznanjima tim više što je dostupnim eksperimentalnim metodama praktički nemoguće utvrditi termodinamiku vezanja molekula vode u aktivno mjesto enzima. Kao što je već navedeno, rezultati modeliranja su pokazali da u slučaju hidrofobnih mutanata kod Dke1 ne dolazi do značajnih promjena u hidrataciji aktivnog mjesta, ali ni u stabilnosti metalnog iona. No kod hidrofilnih mutanata situacija je nešto drugačija. Kod Arg80Ala mutanta dolazi do reorijentacije Glu98 te on više ne koordinira metalni ion već uspostavlja jaku vodikovu vezu s His104. U mutantima Glu98Gln i Tyr70Ala sklonost stvaranja vodikove veze s His104 pokazao je Glu11 (tablica 3.7.). Nadalje je primijećeno da u kompleksima liganda s hidrofilnim mutantima Tyr70Ala i Glu98Gln, Arg80 tijekom 20-30% vremena tvori vodikovu vezu sa His104 (tablica 6.9. u dodatku). Navedene interakcije smanjuju stabilnost metalnog iona u enzimu te mijenjaju mehanizam njegovog transporta kroz protein. Interakcije između Glu11, His104 i Glu98 u simuliranim kompleksima prikazane su na slici 3.19.b. Računanje slobodne energije hidratiziranog metalnog iona, kod Dke1, ne samo da je pojasnio eksperimentalne, spektrofotometrijske i rezultate masene spektroskopije, već je omogućilo fizikalni uvid u sam proces vezanja i koncentrirano djelovanje aminokiselinskih ostataka (posebno Glu11 i Glu98) u transportu metalnog iona prema aktivnom mjestu (tablica 3.10). U nativnom proteinu Glu98 većinu vremena monodentatno koordinira metalni ion, dok se on nalazi u aktivnom mjestu, dok drugi kisik njegove karboksilne skupine tvori vodikovu vezu s Arg80. Migracija metala iz aktivnog mjesta popraćena je s razdvajanjem Arg80 i Glu98. Udaljavanjem bočnog lanca Arg80 u smjeru suprotnom od aktivnog mjesta, Glu98 se odmiče od svog početnog položaja i pri tome povlači metalni ion za sobom te ga izvlači iz aktivnog mjesta (slika 5.2. u dodatku). U slučaju kada je taj događaj popraćen reorijentacijom Glu11, iz susjedne podjedinice, u smjeru metalnog iona, dolazi do nastajanja prijelaznog oblika u kome je metal koordiniran s dva glutamata (slika 3.22.). Odmah nakon toga Glu11 „preuzima“ metalni ion te ga vodi do izlaza iz enzima gdje je izložen okolnom otapalu (slika 3.23.). Važnost Glu11 i Glu98 za transport metala je potvrđena korištenjem različitih računalnih pristupa. Tako su RAMD simulacije, u kojima je radi ubrzavanja procesa izlaska na metalni ion primijenjena slaba nasumična sila. Podaci dobiveni RAMD simulacijama upućuju na tunel T2 kao preferirani put za izlazak  $\text{Fe}^{2+}$  iz enzima, pri čemu glavnu ulogu u transportu metala imaju Glu98 i Glu11.



Ovaj tunel je proširen kod svih hidrofilnih mutanata. U slučajevima kada je metalni ion prema površini enzima krenuo alternativnim putem, kroz tunel T1 na čijem se unutarnjem kraju nalazi Thr107, nije došlo do njegovog izlaska iz proteina (tablica 3.9.).

Izbacivanje supstrata iz aktivnog mjesta Dke1 enzima također je proučavano pomoću RAMD simulacija tijekom kojih su uočene dvije glavne rute koje molekula supstrata koristi da bi izašla iz aktivnog mjesta. U prirodnom proteinu PD se uglavnom transportira kroz T1 tunel, koji se proteže od Arg80 koji se nalazi na površini do Thr107 koji se nalazi u veznom mjestu. U mutantima enzima češće se koristi T3 tunel, na donjem rubu beta bačvice, a okružen je aminokiselinskim ostacima Phe51, Phe59, Phe115 i Phe125 (slika 3.18.). Budući da je alanin manji od fenilalanina, tunel T3 je širi kod mutanata Phe59Ala i Phe115Ala te samim tim prohodniji nego u prirodnom nemutiranom proteinu. Analiza izbacivanja supstrata i produkata kod 3HAO enzima nije rađena, jer je aktivno mjesto izloženo otapalu te lako može doći do njegove izmjene.

Pored modeliranja strukturnih i dinamičkih svojstava enzima i njihovih kompleksa jedan je od najznačajnijih rezultata disertacije utvrđivanje mehanizma reakcije oksidativne transformacije 3-hidroksiantranilne kiseline (3-Ohaa), međuprodukta kinureninskog puta, u kvinolinsku kiselinu (ka), produkta, od strane 3HAO katalizirane reakcije. Utvrđivanje mehanizama enzimatskih reakcija za sada još uvijek nije moguće korištenjem isključivo eksperimentalnih pristupa. Naime eksperimentalni pristupi nam omogućuju mjerenje početnog i konačnog stanja te brzine i efikasnosti pretvorbe, no međustanja i submolekularne promjene do kojih tijekom reakcija dolazi, za sada su još uvijek skriveni očima eksperimentalaca. Istina, vremenski ovisna difrakcija napreduje u tom smjeru, no rezultati su za sada oskudni i teško dosežni.

Korištenjem kombiniranog kvantno mehaničkog-molekulske mehaničkog pristupa uspjeli smo odrediti profil enzimski katalizirane reakcije i utvrdili smo da se proces oksidativne pretvorbe 3-Ohaa u ka odvija preko 4 međuprodukta (slika 3.32.). Međuprodukti i produkt odvojeni su s 5 prijelaznih stanja pri čemu je energija drugog prijelaznog stanja (tablica 3.16.), koje odgovara cijepanju molekule kisika, najviša, pa možemo reći da je to korak koji određuje brzinu reakcije. Kod QM/MM računa ona je nešto niža od 25 kcal/mol, što je gornja granica za prijelazne energije u enzimski kataliziranim reakcijama. No energija konačnog stanja, produkta (I6) nastalog oksidacijom reaktanta u aktivnom mjestu enzima, je čak 59,8 kcal/mol niža od energije početnog sustava. Reaktant je u početnom sustavu

stabiliziran interakcijom s Arg43, a preko karbonilnog kisika monodendantno koordinira ion željeza (slika 3.32.). Nastali produkt koordinira  $\text{Fe}^{2+}$  bidentantno preko karboksilne skupine. Druga karboksilna skupina produkta ostala je povezana s Arg43 preko vodikove veze. Niža energija produkta je teorijski dokaz da enzim 3HAO spontano katalizira pretvorbu 3-hidroksiantranilne kiseline u 2-amino 3-hidroksi mukonat semialdehid.

## 5. ZAKLJUČAK

Primjenom računalnih metoda na biološke sustave, u kojima su glavni predmet istraživanja bili enzimi dioksigenaze, pojasnili smo eksperimentalne rezultate te razotkrili svojstva navedenih enzima koja su bila izvan dosega dostupnih eksperimentalnih metoda. Koristeći MD simulacije proučavana su dinamička i strukturna svojstva eksperimentalno okarakteriziranih, o željezu ovisnih dioksigenaza Dke1 i 3HAO, a zatim su rezultati dobiveni *in silico* uspoređeni s eksperimentalnim vrijednostima. Proučavan je utjecaj točkastih mutacija na afinitet vezanja molekula vode i metalnog iona u aktivno mjesto enzima, na strukturu i dinamička svojstva enzima, posebno na stabilnost vodikovih veza između, za aktivnost enzima, relevantnih aminokiselinskih ostataka te na koordinaciju metalnog iona i na način vezanja supstrata.

Kako bi navedene studije bile moguće odredili smo, korištenjem kvantno mehaničkih računa na modelnim sustavima, parametre za željezo smješteno u aktivnom mjestu navedenih ne-hem dioksigenaza. Parametri su testirani na sustavima s nativnim Dke1 enzimom te osim na te, primijenjeni su na sustave s mutantima Dke1 i na sustave s 3HAO varijantima. Nadalje, ti parametri mogu se koristiti u računalnim simulacijama drugih dioksigenaza koje sadrže ne-hem željezo u aktivnom mjestu te tako značajno pojednostavljaju njihovo proučavanje.

Zamijećena je značajna razlika u načinu stabilizacije metalnog iona u sustavima bez i s vezanim supstratom. U oba sustava vezanjem supstrata histidinski aminokiselinski ostaci ostaju u koordinacijskoj sferi metala, dok glutamati ili napuštaju aktivno mjesto ili dolazi do njihove reorijentacije.

Za Dke1 enzim iznimno je značajno to što smo utvrdili posredstvom kojih interakcija s aminokislinskim ostacima metalni ion dolazi do aktivnog mjesta. Pokazali smo da metalni ioni do aktivnog mjesta prometuju istim tunelima koje koriste i molekule vode, uz veću preferiranost tunela T2. Istim tim tunelima prometuju reaktanti i produkti katalitičke reakcije, s tim da oni često koriste i treći, tzv. hidrofobni, tunel (T3) koji molekule vode i metal nikada ne koriste. Taj je tunel, u blizini veznog mjesta, okružen s fenilalaninskim aminokislinskim ostacima, a budući da je fenilalanin hidrofoban, za vodu je potpuno „nezanimljiv“. U 3HAO enzimu tunele nije bilo potrebno locirati, jer je aktivno mjesto izloženo otapalu.

Iznimno važna studija utvrđivanja tijeka, od strane 3HAO katalizirane, reakcije transformacije 3-hidroksiantranilne kiseline je izvedena u više etapa. Najprije smo kvantno

mehaničkim računima na modelnim sustavima potvrdili da se reakcija može odvijati prema shemi predloženoj za sustav s bakterijskim enzimom, a pošto smo dobili potpuni energijski profil pristupili smo računima na realnom sustavu. Korištenjem kombiniranih kvantno mehaničkih-molekulske mehaničke metoda reakcija je modelirana u enzimu, tj. utvrđen je tijek reakcije kataliziran od strane 3HAO. Konačni reakcijski profil potvrdio je pretpostavljeni mehanizam reakcije.

Izložene metode, rezultati i zaključci prikazuju ono što je svojstveno biofizici kao interdisciplinarnom znanstvenom području, a to je korištenje fizikalnih metoda i teorija kako bi se pojasnili procesi u biološkim sustavima. Napose veliki značaj imaju pojašnjenja vezana za 3HAO sustav, koji je sastavni dio ljudskog organizma, iz čega je vidljivo da fizika može doprinijeti spoznajama i u medicini kao grani biologije.

**Tablica 6.1.** Zaposjednutost prve koordinacijske sfere (kugla radijusa 2,5 Å od iona željeza) i kugle radijusa 5 Å od iona željeza molekulama vode tijekom 20 ns MD simulacija (izražena u postotcima ukupnog vremena simulacije). Dane su vrijednosti usrednjene preko svih podjedinica.

|       | WT – PD              |      | WT                   |      | Phe59Ala             |      | Phe115Ala            |      | Phe119Ala            |      |
|-------|----------------------|------|----------------------|------|----------------------|------|----------------------|------|----------------------|------|
| 2.5 Å | Postotak vremena [%] | SD   | Postotak vremena [%] | SD   | Postotak vremena [%] | SD   | Postotak vremena [%] | SD   | Postotak vremena [%] | SD   |
| 0     | 0,9                  | 1,1  | 10,3                 | 8,6  | 7,5                  | 4,8  | 7,7                  | 4,6  | 6,2                  | 4,9  |
| 1     | 99,1                 | 1,1  | 21,0                 | 8,7  | 92,1                 | 4,9  | 92,3                 | 4,5  | 93,8                 | 4,9  |
| 2     | 0,1                  | 0,0  | 68,7                 | 0,4  | 0,4                  | 0,2  | 0,0                  | 0,0  | 0,1                  | 0,0  |
| 5.0 Å | Postotak vremena [%] | SD   | Postotak vremena [%] | SD   | Postotak vremena [%] | SD   | Postotak vremena [%] | SD   | Postotak vremena [%] | SD   |
| 0     | 0,6                  | 1,0  | 6,4                  | 5,1  | 5,4                  | 4,4  | 5,5                  | 4,3  | 4,8                  | 4,9  |
| 1     | 1,0                  | 1,3  | 10,0                 | 3,7  | 1,4                  | 01,0 | 12,1                 | 17,4 | 23,5                 | 11,2 |
| 2     | 8,4                  | 7,5  | 43,5                 | 39,1 | 5,0                  | 3,7  | 20,1                 | 10,9 | 18,12                | 5,2  |
| 3     | 22,7                 | 12,7 | 16,4                 | 18,6 | 28,7                 | 12,8 | 22,1                 | 14,9 | 18,3                 | 12,5 |
| 4     | 29,8                 | 4,3  | 3,7                  | 5,4  | 29,2                 | 5,5  | 25,8                 | 14,5 | 20,7                 | 5,3  |
| 5     | 23,0                 | 13,5 | 6,8                  | 11,7 | 24,4                 | 9,8  | 11,9                 | 6,2  | 11,0                 | 3,2  |
| 6     | 10,2                 | 6,6  | 8,9                  | 15,3 | 5,4                  | 3,0  | 2,2                  | 1,6  | 3,1                  | 2,9  |
| 7     | 3,6                  | 2,3  | 4,3                  | 7,4  | 0,4                  | 0,3  | 0,3                  | 0,4  | 0,4                  | 0,5  |
| 8     | 0,7                  | 0,6  | 0,1                  | 0,2  | 0,0                  | 0,0  | 0,0                  | 0,0  | 0,0                  | 0,0  |
| 9     | 0,1                  | 0,1  |                      |      |                      |      |                      |      |                      |      |

**Tablica 6.2.** Katalitička aktivnost utvrđena pomoću kinetike ravnotežnog stanja.

| Varijant      | $k_{app\ PD}^{cat}$<br>[ $s^{-1}mM^{-1}$ ] |
|---------------|--|
| Prirodni Dke1 | 6,6  |
| Phe59Ala      | 0,7  |
| Phe115Ala     | 1,4  |
| Phe119Ala     | 3,2  |

**Tablica 6.3.** Postotak vremena tijekom kojeg su vodikove veze Glu98(OE1/2) – His104(NE2) i Glu11(OE1/2) – His104(NE2) prisutne u simulacijama s apo enzimima

|                            | WT   | Glu98Gln | Tyr70Ala | Arg80Ala |
|----------------------------|------|----------|----------|----------|
| Glu11(OE1/2) – His104(NE2) | 0,1  | 0,2      | 0,0      | 7,6      |
| Glu98(OE1/2) – His104(NE2) | 56,3 | 5,4      | 73,9     | 19,1     |

**Tablica 6.4.** Postotak vremena kada Glu98/Gln98 koordinira  $Fe^{2+}$  monodentatno ili bidentatno u simulacijama kada nisu korišteni vezni parametri

| Koordinacija [% vremena simulacije] | WT   | Arg80Ala | Tyr70Ala | Glu98Gln |
|-------------------------------------|------|----------|----------|----------|
| Monodentatno                        | 97,5 | 77,3     | 87,5     | 70,8     |
| Bidentatno                          | 2,5  | 22,7     | 4,8      | 0,0      |
| Odnos [bi/mono]                     | 0,0  | 0,3      | 0,1      | 0,0      |

**Tablica 6.5.** Stopa gubitka  $Fe^{2+}$  i standardna devijacija [101]

| Varijant      | k [ $min^{-1}$ ] | SD [%] |
|---------------|------------------|--------|
| Prirodni Dke1 | 0,16             | 0,43   |
| Tyr70Ala      | 0,01             | 0,96   |
| Arg80Ala      | 0,23             | 0,26   |
| Glu98Gln      | 0,03             | 0,16   |

**Tablica 6.6.** Konačni položaji metalnog iona inicijalno postavljenog u tunele kojima prometuju molekule vode, na udaljenosti do 2,5 Å od hidroksilne skupine Tyr70A (ovo područje je dio oba tunela, T1 i T2).

| Sustav kojem je Fe <sup>2+</sup> dodan | Podjedinica A   | Podjedinica B | Podjedinica C | Podjedinica D |
|--|---|---------------|---------------|---------------|
|  | <b>Položaji Fe<sup>2+</sup> na završetku simulacija</b> |               |               |               |
| <b>WT</b>                              | CA  | D             | A             | D2            |
| <b>WT**</b>                            | <b>A1</b>   | D             | A             | <i>S</i>      |
| <b>WT*</b>                             | <b>A1</b>   | D             | <b>A1</b>     | <i>S</i>      |
| <b>WT + Fe<sup>2+</sup></b>            | D2  | D2            | D             | D2            |
| <b>WT + AC + Fe<sup>2+</sup></b>       | D   | D             | D             | D             |
| <b>Tyr70Ala</b>                        | D   | CA            | D             | D2            |
| <b>Tyr70Ala*</b>                       | D2  | D             | D             | <i>E</i>      |
| <b>Arg80Ala</b>                        | <i>E</i>  | D             | CA            | D2            |
| <b>Glu98Gln</b>                        | CA  | D2            | D2            | D2            |

**A** = Fe<sup>2+</sup> u aktivnom mjestu koordiniran Glu98 i 3 His-a = „idealni položaj“

**A1** = Fe<sup>2+</sup> u aktivnom mjestu koordiniran Glu98 i jedan ili dva His-a

**CA** = u odnosu na inicijalni položaj Fe<sup>2+</sup> se pomaknuo prema aktivnom mjestu i završio vrlo blizu „idealnom“ položaju, (do 5 Å od njega), ali koordinacija Glu98 i histidinima nije uspostavljena, ili je uspostavljena samo jednim od 3 His-a

**D** = Fe<sup>2+</sup> u „alternativnom“ veznom mjestu, koordiniran Glu98 i Glu11 iz susjedne podjedinice

**D1** = Fe<sup>2+</sup> u blizini alternativnog veznog mjesta, koordiniran samo Glu 98 ili Glu11 iz susjedne podjedinice

**D2** = Fe<sup>2+</sup> se pomjerio prema alternativnom veznom mjestu u odnosu na početni položaj, ali nije uspostavio koordinaciju niti s Glu98 niti s Glu11

**S** = Fe<sup>2+</sup> na površini proteina koordiniran sa Glu85

**E** = Fe<sup>2+</sup> napustio protein i završio u otapalu

**Tablica 6.7.** Usporedba sadržaja  $\text{Fe}^{2+}$  za različite varijante enzima izračunate a) spektrofotometrijski, i b) ICP-MS

| Mutant    | Fe(II)%      |                |
|-----------|--------------|----------------|
|           | FereneS (a)  | ICP-MS (b)     |
| WT        | $60 \pm 2,5$ | $65 \pm 2,3$   |
| Tyr70Ala  | $50 \pm 8,7$ | $49,8 \pm 8,7$ |
| Glu98Gln  | $40 \pm 3,5$ | $46,2 \pm 1,4$ |
| Arg80Ala  | $45 \pm 1$   | $53,7 \pm 2,9$ |
| Thr107Ala | $< 10$       | $< 10$         |

**Tablica 6.8.** [23] Kinetički parametri za 3HAO mutante. Navedeni su aminokiselinski ostatci u bakterijskom ortologu, te njihovi ekvivalneti u humanom

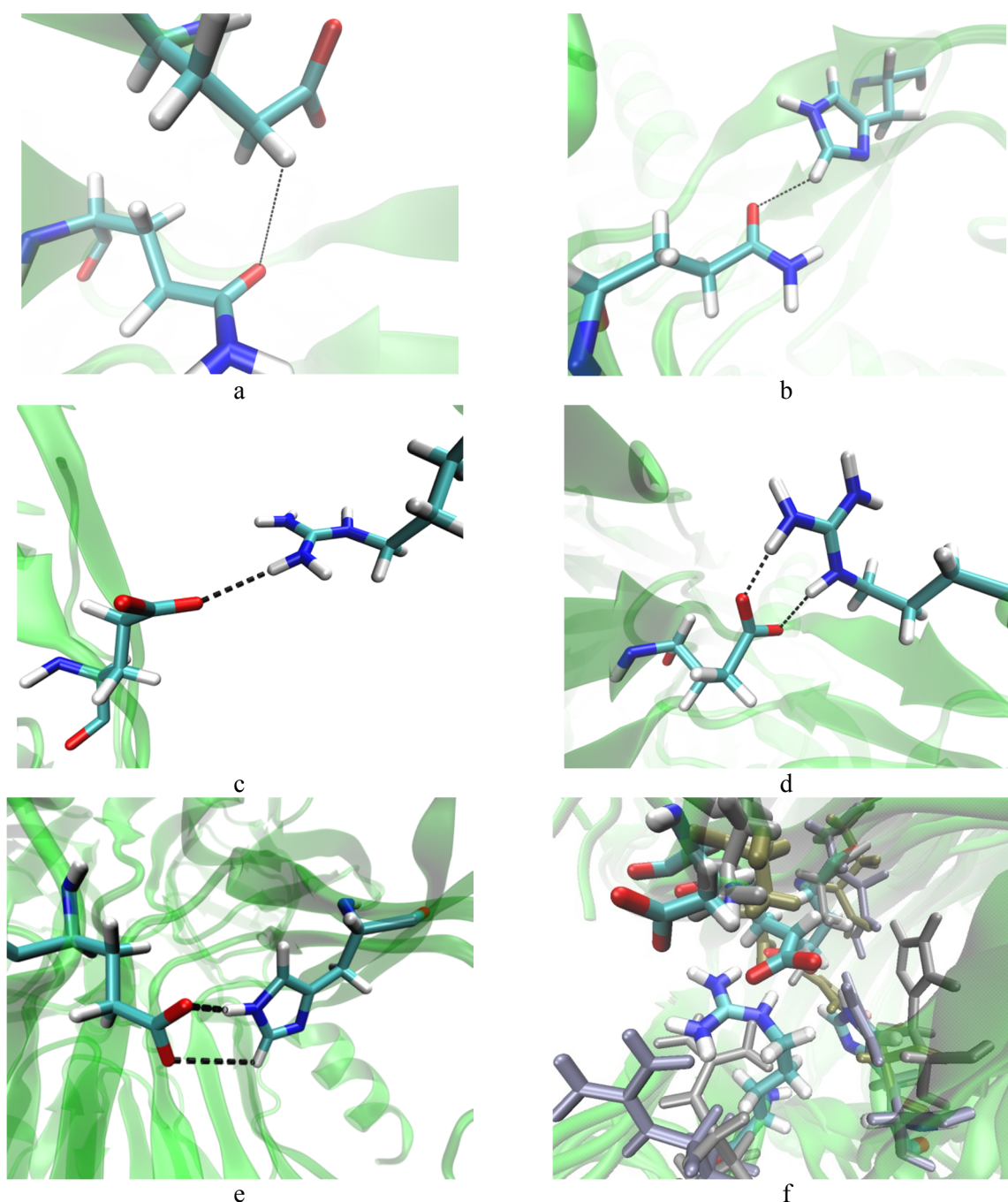
| Bakterijski | Humani    | $K_m$ (HAA, $\mu\text{M}$ ) | $K_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ ) | $K_{cat}/K_m$ ( $\text{s}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$ ) |
|-------------|-----------|-----------------------------|-------------------------------|---|
| WT          | WT        | $22,4 \pm 2,7$              | 25                            | 1,116   |
| Arg47Ala    | Arg43Ala  | $147,0 \pm 14,0$            | 0,022                         | $0,15 \cdot 10^{-3}$                              |
| Arg99Ala    | Arg95Ala  | $872,0 \pm 140$             | 0,0046                        | $0,005 \cdot 10^{-3}$                             |
| Glu110Ala   | Glu105Ala | $10,2 \pm 1,1$              | 0,012                         | $1,17 \cdot 10^{-3}$                              |

**Tablica 6.9.** Vodikove veze između aminokiselinskih ostataka Arg80 – His104, i Met117 – His64 u simulacijama gdje su vezani metal i supstrat te su korišteni vezni parametri

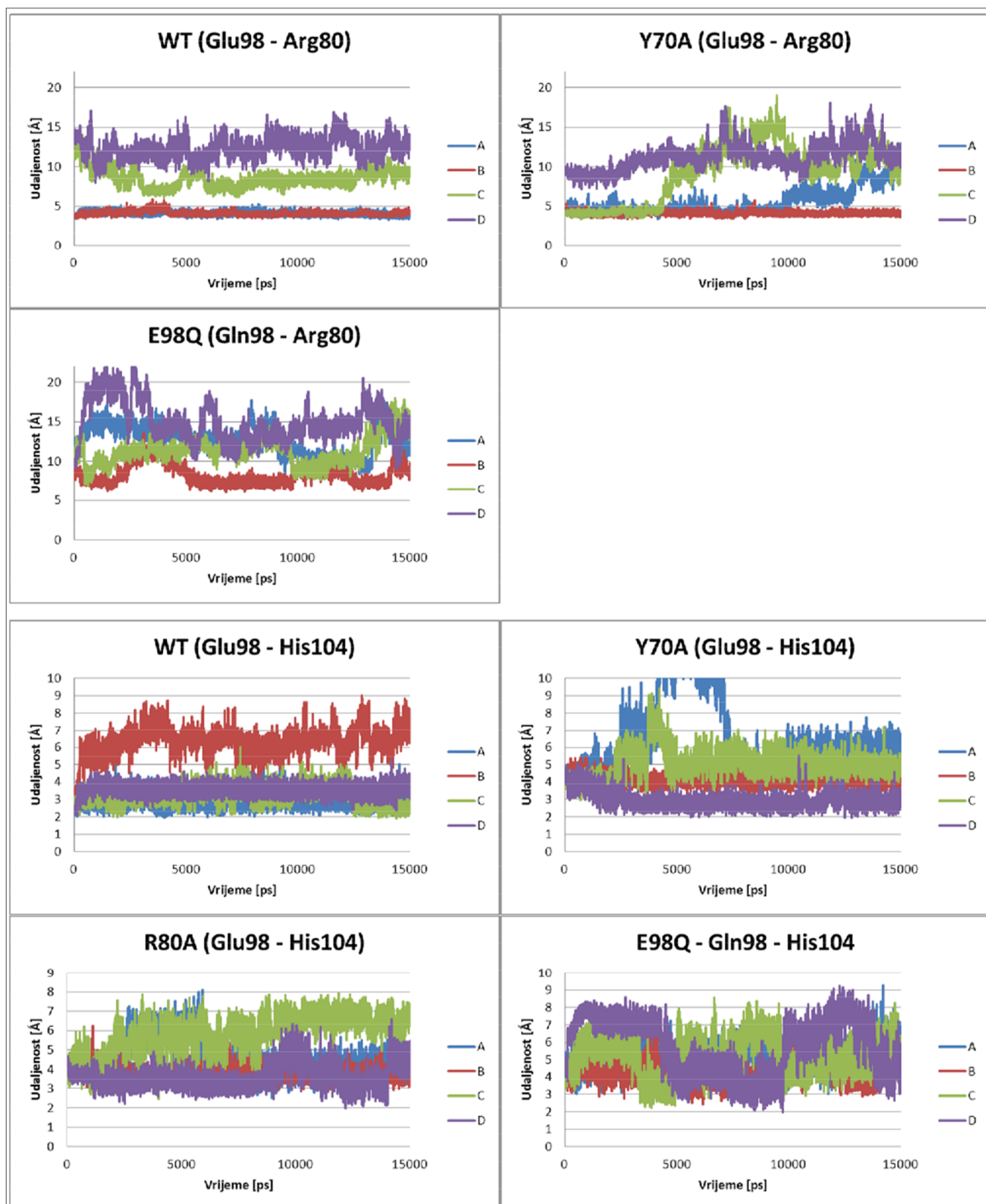
|                          | WT | Tyr70Ala | Arg80Ala | Glu98Gln |
|--------------------------|----|----------|----------|----------|
| Arg80(NH2) – His104(NE2) | -  | 20       | -        | 27       |
| Met117(CE) – His64(ND1)  | 54 | 13       | 32       | 14       |



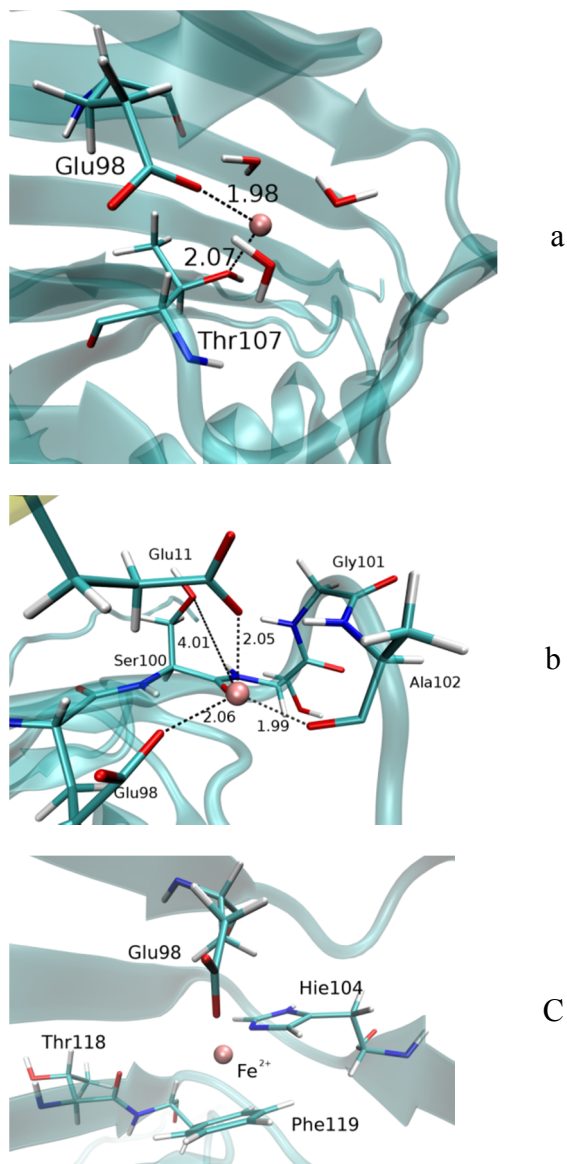
## 6.2. DODATAK B - Slike



**Slika 6.1.** Karakteristične vodikove veze zamijećene tijekom simulacija Dke1 i mutanata: a) Gln98(OE1) – Glu11(HG) u Glu98Gln mutantu; b) Gln98(OE1) – His104 (HE1) u Glu98Gln mutantu; c) Arg80(NH2) – Glu98(OE1,2) u Tyr70Ala mutantu; d) Arg80(NE) – Glu98(O1,2) u prirodnom Dke1; e) Glu11(OE2,3) – His104(NEH) vodikove veze su uobičajene u Arg80Ala mutantu; f) preklopljene strukture (prikazani su Arg80, Glu98, His104 i Glu11 iz susjedne podjedinice), aminokiselinski ostaci koji propadaju prirodnom nemutiranom tipu proteina su obojeni prema vrsti atoma, a aminokiselinski ostaci mutanata su obojani sivo – tamno žuto.



**Slika 6.2.** Udaljenosti između Glu98 i Arg 80 te His104 i Glu98 u sve četiri podjedinice tijekom prvih 15 ns kod različitih varijanata Dke1.



**Slika 6.3.** Položaji  $\text{Fe}^{2+}$  (roza kuglica) pri završetku RAMD simulacija a) u susjedstvu Thr107; b) u blizini Glu11 (iz susjedne podjedinice) – analizirana podjedinica je prikazana u prozirnoj tirkiznoj boji, dok je susjedna prikazana u žutoj prozirnoj reprezentaciji; c) u blizini Phe119

### 6.3. DODATAK C – Kratice

|         |   |
|---------|---|
| 3HAO    | 3,4-dioksidgenaza 3-hidroksiantranilne kiseline   |
| 3-Ohaa  | 3-hidroksiantranilna kiselina   |
| Å       | Angstrom ( $10^{-10}$ m), mjerna jedinica za duljinu  |
| AC      | acetat  |
| Ala     | aminokiselina alanin (ponekada oznaka A)  |
| Arg     | aminokiselina arginin (ponekada oznaka R)   |
| B3LYP   | DFT funkcional  |
| CPCM    | metoda za simuliranje prisutnosti otapala ( <i>engl.</i> Conductor-like PCM)  |
| DFT     | QM funkcional/metoda ( <i>engl.</i> Density Functional Theory)  |
| Dke1    | dioksidgenaza za cijepanje diketona   |
| EE      | elektronsko uklapanje ( <i>engl.</i> Electronical Embedding)  |
| ESP     | ElektroStatski Potencijal   |
| Gln     | aminokiselina glutamin (ponekada oznaka Q)  |
| Glu     | proteinogena aminokiselina glutaminska kiselina (ponekada oznaka E)   |
| Gly     | aminokiselina glicin (ponekada oznaka G)  |
| Ha      | Hartree, atomska jedinica za energiju (627,5094742772 kcal/mol)   |
| HF      | QM funkcional/metoda ( <i>engl.</i> Hatree-Fock)  |
| His     | aminokiselina histidin (ponekada oznaka H)  |
| I       | međustanje ( <i>engl.</i> Intermediate)   |
| ka      | Kvinolinska kiselina  |
| Leu     | aminokiselina leucin (ponekada oznaka L)  |
| MD      | Molekulska Dinamika   |
| ME      | mehaničko uklapanje ( <i>engl.</i> Mechanical Embedding)  |
| MG      | metilglikoksal  |
| MM      | Molekulska Mehanika   |
| MM-PBSA | metoda za račun slobodne energije vezanja ( <i>engl.</i> Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Solvent Accessible Area) |
| NPT     | izotermn-izobarni ansambl (konstantan broj molova N, tlak P i temperatura T)  |
| NVE     | mikrokanonski ansambl (konstantan broj molova N, volumen V i energija E)  |

|       |   |
|-------|---|
| NVT   | kanonski ansambl (konstantan broj molova N, volumen V i temperatura T)                              |
| ONIOM | QM/MM metoda ( <i>engl.</i> Our own N-layered Integrated molecular Orbital and Molecular mechanics) |
| PBC   | periodski rubni uvjeti ( <i>engl.</i> Periodic Boundary Conditions)                                 |
| PCM   | metoda za simuliranje prisutnosti otapala ( <i>engl.</i> Polarizable Continuum Model)               |
| PD    | 2,4-pentandion  |
| PDB   | proteinska baza podataka ( <i>engl.</i> Protein Data Bank)  |
| Phe   | aminokiselina fenilalanin (ponekada oznaka F)   |
| PME   | metoda za računanje elektrostatskih interakcija ( <i>engl.</i> Particle Mesh Ewald)                 |
| QM    | kvantna mehanika ( <i>engl.</i> Quantum Mechanics)  |
| QM/MM | kvantno mehanički-molekulska mehanički  |
| RAMD  | MD simulacije s nasumičnim ubrzanjem ( <i>engl.</i> Random Acceleration Molecular Dynamics)         |
| RMSD  | srednji kvadratni korjen ( <i>engl.</i> Root Mean Square Deviation)                                 |
| RMSF  | aminokiselinske fluktuacije ( <i>engl.</i> Root Mean Square Fluctuations)                           |
| SASA  | površina dostupna otapalu ( <i>engl.</i> Solvent Accessible Surface Area)                           |
| SMD   | usmjerene MD simulacije ( <i>engl.</i> Steered Molecular Dynamics)                                  |
| TS    | prijelazno stanje ( <i>engl.</i> Transition State)  |
| Tyr   | aminokiselina tirozin (ponekada oznaka Y)   |
| TZV   | bazni skup ( <i>engl.</i> Triple Zeta Valence)  |
| WT    | prirodni nemutirani tip proteina ( <i>engl.</i> Wild Type)  |

## 7. POPIS LITERATURE

- [1] O. Hayaishi, M. Nozaki, M. T. Abbott , *3Oxygenases: Dioxygenases*; u P.D. Boyer (Ur) *Enzymes*, Vol. **12**, Elsevier Inc. (1975) str 119-189
- [2] R. R. Crichton, R. J. Ward, *Met. Ions. Biol. Syst.* **35**, 633-65 (1998)
- [3] I. Bertini, A. Sigel; *Handbook of metalloproteins*, Vol. **1** CRC Press (2001)
- [4] G. Straganz, L. Brecker, H. J. Weber, W. Steiner, D. W. Ribbons, *Bio-phys. Res. Commun.* **297**, 232 (2002)
- [5] J. C. Venter, K. Remington, J. F. Heidelberg, i sur., *Science* **304**, 66 (2004)
- [6] COMMISSION DECISION of 18 May 2005 amending Decision 1999/217/EC as regards the register of flavouring substances used in or on foodstuffs (notified under document number C (2005) 1437)
- [7] G. D. Straganz, A. Glieder, L. Brecker, D. W. Ribbons, W. Steiner; *Biochem. J.* **369**, 573 (2003)
- [8] GD Straganz, H Hofer, W Steiner, B Nidetzky, *J. Am. Chem. Soc.* **126** (2004)
- [9] GD Straganz, B Nidetzky. *J. Am. Chem. Soc.* **127** (2005)
- [10] <http://www.uniprot.org/uniprot/Q8GNT2>
- [11] S. Leitgeb, G. D. Straganz, B. Nidetzky, *Biochem. J.* **418** (2009)
- [12] H. Brkić, D. Bongiorno, M. Ramek, G. Straganz, S. Tomić, *J. Biol. Inorg. Chem.* **17**, 801(2012)
- [13] E. I. Solomon, T. C. Brunold, M. I. Davis, i sur. *Chem. Rev.* **100**, **235** (2000)
- [14] A. R. Diebold, M. L. Neidig, G. R. Moran, G. D. Straganz, E. I. Solomon; *Biochemistry* **49**, 6945 (2010)
- [15] G. D. Straganz, A. R. Diebold, S. Egger, B. Nidetzky, E. I. Solomon *Biochemistry* **49**, 996 (2010)

- [16] A. R. Diebold, G. D. Straganz, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 15979 (2011).
- [17] <http://www.uniprot.org/uniprot/P46952>
- [18] E. Bitto, C. A. Bingman, G. E. Wesenberg, G. N. - *neobjavljeno*
- [19] P. Malherbe, C. Kohler, M. Da Prada, i sur., *J. Biol. Chem.*, **269**, 13792 (1994)
- [20] R. K. Murray, D. A. Bender, K. M. Botham, P. J. Kennely, V. W. Rodwell, P. A. Weil, *Harpers illustrated biochemistry*, McGraw Hill, New York, 2012.
- [21] R. H. McMenamy, *J. Biol. Chem.* **240**, 4219 (1965).
- [22] A. C. Foster, B. J. White, R. J. Schwarez, *Neuro. Chem.*, **47**, 22 (1986).
- [23] Y. Zhang, K. L. Colabroy, T. P. Begley, S. E. Ealick, *Biochemistry*, **44**, 7632 (2005)
- [24] K. L. Colabroy, H. Zhai, T. Li, Y. Ge, Y. Zhang, A. Liu, S. E. Ealick, F. W. McLafferty, T. P. Begley, *Biochemistry* **44**, 7623 (2005)
- [25] V. K. Agrawal, R. Sohgaure, P. V. Khadikar, *Bioorg. Med. Chem.* **9**, 3295 (2001).
- [26] E. Clifford, G. Frenking, S. K. Kwang, G. E. Scuseria, *Chapter 1 – Computing technologies, theories, and algorithms. The making of 40 years and more of theoretical and computational chemistry*, u E. Clifford, G. Frenking, S. K. Kwang, G. E. Scuseria, (Ur) *Theory and Applications of Computational Chemistry*, Elseiver **1** (2005) str 1-7
- [27] N. Díaz, D. Suárez, K. M. Merz, *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 4197 (2001).
- [28] A Leach, *Molecular Modelling: Principles and Applications*, Paerson, Harlow, **2** (2001)
- [29] [http://ambermd.org/tutorials/advanced/tutorial5\\_amber11/images/PEsurf-endpoints.jpg](http://ambermd.org/tutorials/advanced/tutorial5_amber11/images/PEsurf-endpoints.jpg)
- [30] L. Verlet, *Physical Review* **159**, 98 (1967).
- [31] W. C. Swope, H. C. Andersen, P. H. Berens, K. R. Wilson, *J. Chem. Phys.* **76**, 637 (1982)
- [32] J. P. Ryckaert, G. Ciccotti, H. J. C. Berendsen, *J. Comput. Phys.* **23**, 327 (1977)

- [33] G. S. Grest, K. Kremer, *Phys. Rev. A*, **33**, 3628 (1986)
- [34] S. Nose, M. L. Klein; *Mol. Phys.* **52**, 1055 (1983)
- [35] H. J. C. Berendsen i sur., *J. Chem. Phys.* **81**, 3684 (1984)
- [36] T. Darden, D. Pearlman, L. G. Pedersen, *J. Chem. Phys.* **109**, 10921 (1998)
- [37] [http://sf.anu.edu.au/collaborations/amber\\_on\\_fujitsu/amber-12/tutorial/standard-setup/tr-octahedron.png](http://sf.anu.edu.au/collaborations/amber_on_fujitsu/amber-12/tutorial/standard-setup/tr-octahedron.png)
- [38] [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Truncated\\_octahedra.png](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Truncated_octahedra.png)
- [39] P. P. Ewald, *Ann. Phys.* **369**, 253 (1921)
- [40] S. Park, F. Khalili-Araghi, E. Tajkhorshid, K. Schulten, *J. Chem. Phys.* **119**, 3559 (2003).
- [41] S. K. Luedemann, V. Lounnas, R. C. Wade, *J. Mol. Biol.* **303**, 797 (2000)
- [42] C. H. Tan, Y. H. Tan, R. Luo, *J. Phys. Chem. B.*, **111**, 12263 (2007)
- [43] H. C. Berendensen, J. P. M. Postma, J. F. van Gunteren, J. Hermanset, *Intramolecular Forces*, **14**, 331 (1981)
- [44] W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey, M. L. Klein; *J. Chem. Phys.*, **79**, 926 (1983).
- [45] D. A. Case, T. A. Darden i sur, AMBER 12 (2012)
- [46] A. W. Goetz, M. J. Williamson, D. Xu, D. Poole, S. L. Grand, R. C. Walker, *J. Comp. Theo. Chem.*, 2012 u tisku.
- [47] R, Salomon-Ferrer, A. W. Goetz, D. Poole, S. L. Grand, R. C. Walker, *J. Comp. Theo. Chem.*, 2012, u pripremi.
- [48] C. Froese Fischer, *The Hartree-Fock Method for Atoms: A Numerical Approach*, John Wiley & Sons Inc (1977)
- [49] R. G. Parr, W. Yang, *Density-Functional Theory of Atoms and Molecules*, Oxford University Press (1989) J. J. P. Stewart, *J. Mol. Modeling*, **13**, 1173 (2007)



- [50] P. Hohenberg, W. Kohn, *Phys. Rev.* **136**, B864 (1964)
- [51] W. J. Hehre, R. F. Stewart, J. A. Pople, *J. Chem. Phys* **51**, 2657 (1969)
- [52] S. Miertus, E. Scrocco, J. Tomasi, *Chem. Phys.* **55**, 117 (1981)
- [53] V. Barone, M. Cossi, *J. Phys. Chem. A*, **102**, 1995 (1998).
- [54] M. W. Schmidt, K. K. Baldridge, J. A. Boatz, i sur. *J. Comput. Chem.* **14**, 1167 (1993)
- [55] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, i sur. Gaussian 09, Revision A.02, Wallingford CT, 2009
- [56] M. Svensson, S. Humbel, R. D. J. Froese, T. Matsubara, S. Sieber, K. Morokuma, *J. Phys. Chem.* **100**, 50 (1996)
- [57] J. Wang, P. Cieplak, P. A. Kollman, *J. Comput. Chem.* **21** 1049 (2000)
- [58] T. Vreven, K. S. Byun, I. Komaromi, D. Dapprich, J. A. Montgomery Jr, K. Morokuma, M. J. Frisch, *J. Chem. Theory Comput.* **2**, 815 (2006)
- [59] J. J. P. Stewart, *J. Mol. Modeling* **13**, 1173 (2007)
- [60] J. J. P. Stewart, MOPAC2012, [HTTP://OpenMOPAC.net](http://OpenMOPAC.net) (2012).
- [61] M. Prokop, J. Damborsky, J. Koca, *Bioinformatics* **16**, 854 (2000)
- [62] J. Damborsky, M. Prokop, J. Koca, *Trends in Biochemical Sciences* **26**, 71(2001).
- [63] M. Cernohorsky, M. Kutý, J. Koca, *Computers and Chemistry* **21**, 35 (1997)
- [64] M. R. Lee, Y. Duan, P. A. Kollman, *Proteins* **39**, 309 (2000)
- [65] <http://ambermd.org/tutorials/advanced/tutorial3/images/figure2.gif>
- [66] H. J. Böhm, G. Klebe, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **35**, 2588 (1996);
- [67] A. Ajay, M. A. Murcko, *J. Med. Chem.* **41**, 4953 (1995)
- [68] G. M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M. F. Sanner, R. K. Belew, D. S. Goodsell, A. J. Olson, *J. Comput. Chem.* **16**, 2785 (2009)
- [69] E. Chovancová, A. Pavelka, P. Beneš i sur., *CAVER 3.0: u přípravě*, 2012

- [70] The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2.3, Schrödinger, LLC
- [71] P. O. A. Goodford, *J. Med. Chem.* **28**, 849 (1985)
- [72] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, *J. Molec. Graphics* **14**, 33 (1996)
- [73] L. B. Kier, L. H. Hall. *Molecular Connectivity in Structure–Activity Relationship*; Wiley: New York, 1986
- [74] Y. Duan, C. Wu, S. Chowdhury i sur., *J. Comput. Chem.* **24**, 1999 (2003)
- [75] A. A. Skjevik, B. D. Madej, R. C. Walker, K. Teigen *A comprehensive modular lipid force field for amber*, U tisku, 2012
- [76] J. Wang, R. M. Wolf, J. W. Caldwell, P. A. Kollamn, D. A. Case. *J. Comput. Chem* **25**, 1049(2004)
- [77] A. D. McLean, G. S. Chandler, *J. Chem. Phys.*, **72**, 5639 (1980)
- [78] K. Raghavachari, J. S. Binkley, R. Seeger, J. A. Pople, *J. Chem. Phys.*, **72**, 650 (1980)
- [79] U. C. Singh, P. A. Kollman, *J. Comp. Chem.*, **5**, 521 (1984)
- [80] P. J. Stephens, K. J. Jalkanen, R. W. Kawiecki, *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 6518 (1990)
- [81] R. S. Mulliken, *J. Chem. Phys.* **23**, 1833 (1955).
- [82] C. C. J. Roothaan, *Rev. Mod. Phys.* **23**, 69 (1951).
- [83] J. A. Pople, R. K. Nesbet, *J. Chem. Phys.* **22**, 571 (1954)
- [84] <http://www.srce.unizg.hr/proizvodi-i-usluge/racunalni-resursi/racunalni-klaster-isabella>
- [85] [www.cro-ngi.hr](http://www.cro-ngi.hr)
- [86] B. R. Miller, T. D. McGee, J. M. Swails, N. Homeyer, H. Gohlke, A. E. Roitberg, *J. Chem. Theory Comput.* **9**, 3314 (2012)
- [87] D. Frishman, P. Argos, *Proteins: Structure, Function, and Genetics* **23**, 23566 (1995)
- [88] A. Klamt, G. Schüumann, *J. Chem. Soc. Perkin Transactions* **2**, 799 (1993)

- [89] R. Ditchfield, W. J. Hehre, J. A. Pople, *J. Chem. Phys.* **54**, 2257 (1971)
- [90] V. A. Rassolov, M. A. Ratner, J. A. Pople, P. C. Redfern, L. A. Curtiss, *J. Comp. Chem.* **22**, 1223 (2001)
- [91] S. L. Chen, W. H. Fang, F Himo, *J. Phys. Chem. B* **111**, 1253 (2007)
- [92] L. A. Curtiss, M. P. McGrath, J. P. Blaudeau, N. E. Davis, R. C. Binning, L. Radom *J. Chem. Phys.* **103**, 6104 (1995)
- [93] T. H. Dunning Jr., P. J. Hay, u *Modern Theor. Chem.* Vol **3**, Plenum, New York (1976), str. 1-28
- [94] H. Brkić, B. Kovačević, S.Tomić, *u pripremi*
- [95] A. Schäfer, H. Horn, R. Ahlrichs, *J. Chem. Phys* **97**, 2571 (1992)
- [96] A. Schäfer, C. Huber, R. Ahlrichs, *J. Chem. Phys* **100**, 5829 (1994)
- [97] V. A. Rassolov, J. A. Pople, M. A. Ratner, T. L. Winduis, *J. Chem. Phys* **109**, 1223 (1998)
- [98] H. Jahn, E. Teller, *Proceedings of the Royal Society A* **161**, 220 (1937)
- [99] B. Gopal, L. L. Madan, S. F. Betz, A. A. Kossiakoff, *Biochemistry* **44**, 193 (2005)
- [100] S. Fischer, C. A. S. Verma, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 9613 (1999) 9613–9615
- [101] G. Straganz, S. Tomic, D. Boungiorno, H. Brkić *Rad u pripremi*
- [102] G. Dong, S. Shaik, W. Lai, *Chem. Sci.* **4**, 3624 (2013)

## Životopis

Rođen sam u Vinkovcima 1983., gdje sam pohađao osnovnu školu Bartola Kašića, i gimnaziju Matije Antuna Reljkovića. 2003. upisujem studij Fizike i tehničke kulture s informatikom na Odjelu za fiziku sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, gdje sam, 2007. godine dobio Rektorovu nagradu i Nagradu pročelnika kao student s najvišim prosjekom ocjena. Diplomirao sam sa radom „Račun pogrešaka fizikalnih mjerenja“ pod vodstvom prof. dr. sc. Branka Vukovića. Nakon završetka studija i kratkotrajnog zaposlenja u OŠ Nikole Tesle u Mirkovcima, zapošljava me na Medicinskom fakultetu u Osijeku na radnom mjestu asistenta u Katedri za biofiziku, medicinsku statistiku i medicinsku informatiku, gdje radim i danas. Poslijediplomski studij Fizike, smjer biofizika na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu upisao sam 28.5. 2008. godine.

### Popis objavljenih radova:

#### Poglavlja u knjizi:

- D. Faj, T. Ružman, H. Brkić, M. Kasabašić *Fizika plinova i uvjeti rada u dvorani* // Klinička anesteziologija / Zagreb : Medicinska naklada (2013) Str. 421-442.

#### Izvorni znanstveni i pregledni radovi u CC časopisima:

- Z. Vrselja, H. Brkić, S. Mrdenović, R. Radić, G. Ćurić *Function of Circle of Willis*. // Journal of cerebral blood flow and metabolism. (2014) doi:10.1038/jcbfm.2014.7
- H. Brkić, D. Buongiorno, M. Ramek, G. Straganz, S. Tomić *DkeI – Structure, Dynamics and Function, A Theoretical and Experimental Study Elucidated the Role of the Binding Site Shape and the H-Bonding Network in Catalysis*. // Journal of biological inorganic chemistry. **17** (2012) 801-815
- O. Ciraj Bjelac, D. Faj, D. Štimac, D. Kosutic, D. Arandić, H. Brkić *Good reasons to implement quality assurance in nationwide breast cancer screening programs in Croatia and Serbia: results from a pilot study*. // European journal of radiology. **78** (2011) 122-128

Kongresno priopćenje (sažeci) u CC časopisu:

- S. Tomić, H. Brkić, G. Straganz, D. Buongiorno *Non-heme iron dependent enzymes – understanding transport of iron cation in acetylacetone dioxygenase from Acinetobacter johnsonii* // European Biophys. J. Volume **42** Supplement 1, '9th European Biophysics Congress Abstracts' / Watts, A. (ur.). Heidelberg, Njemačka : Springer, 2013. S184-S184

Objavljena pozvana predavanja na skupovima

- T. Sanja, H. Brkić, M. Grabar Branilović, A. Tomić, B. Branimir, M. Šikić, *Proteini i nukleinske kiseline u vremenu i prostoru* // Bioinformatics and biological physics: proceedings of the scientific meeting / Paar, Vladimir (ur.). Zagreb : Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti, 2013. 149-157

Drugi radovi u zbornicima skupova s recenzijom

- Tomić S, Abramić M, Brkić H, Tomić A *Sprega kristalografije i modeliranja u proučavanju bioloških makromolekula* // Kristalografija u Hrvatskoj / Popović Stanko (ur.). Zagreb : Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti, 2013. 129-137

Radovi u zbornicima skupova bez recenzije

- I. Kralik, M. Štefanić, G. Šarić, S. Težak, S. Grbac Ivanković, M Radić Wolfl, D. Posedel, S. Jurković, H. Brkić, D. Faj *The estimation of collective dose from medical exposures from diagnostic nuclear medicine examinations in Croatia* // Proceedings of the ninth symposium of the CRPA / Ž. Knežević, M. Majer, I. Krajcar Bronić(ur.). Zagreb : Stega tisak, 2013. 253-257